

Marta Gascón Ruiz

Poblaciones de linfocitos T y
células NK como biomarcadores
de respuesta al tratamiento con
inmunoterapia en cáncer de
pulmón

Director/es

Pardo Jimeno, Julián
Isla Casado, María Dolores

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

POBLACIONES DE LINFOCITOS T Y CÉLULAS NK
COMO BIOMARCADORES DE RESPUESTA AL
TRATAMIENTO CON
INMUNOTERAPIA EN CÁNCER DE PULMÓN

Autor

Marta Gascón Ruiz

Director/es

Pardo Jimeno, Julián
Isla Casado, María Dolores

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Medicina

2023

POBLACIONES DE LINFOCITOS T Y
CELULAS NK COMO BIOMARCADORES
DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON
INMUNOTERAPIA EN CÁNCER DE
PULMÓN

Autora:

Marta Gascón Ruiz

Directores:

Dolores Isla Casado
Julián Pardo Jimeno

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
2023



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**POBLACIONES DE LINFOCITOS T Y CÉLULAS NK
COMO BIOMARCADORES DE RESPUESTA AL
TRATAMIENTO CON INMUNOTERAPIA EN CÁNCER
DE PULMÓN.**

Autora

Marta Gascón Ruiz

Director/es

Dra. Dolores Isla Casado y Dr. Julián Pardo Jimeno

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA, DERMATOLOGÍA Y PSIQUIATRÍA
2023

Agradecimientos

A mis directores Dolores Isla y Julián Pardo por la ayuda y el apoyo que me han dado a lo largo de estos años. Gracias por guiarme en este proyecto y por estar ahí siempre que os he necesitado.

A todos los amigos que he encontrado durante mi formación en Oncología que me han ayudado a seguir adelante.

A mi familia por creer en mí y ser el apoyo que necesitaba.

A Diego por estar siempre a mi lado y a Lucía por ayudarme en este empujón final.

ÍNDICE

Abreviaturas

1. Introducción

1.1 Epidemiología y factores de riesgo del cáncer de pulmón

1.2 Anatomía Patológica

1.3 Diagnóstico y estadios

1.4 Tratamiento

- 1.4.1 Estadios precoces (estadio I y II)
- 1.4.2 Estadio localmente avanzado (estadio III)
- 1.4.3 Estadio avanzado (estadio IV)

1.5 Inmunología tumoral

1.6 Inmunoterapia en cáncer de pulmón

- 1.6.1 Pembrolizumab
 - Keynote 024
 - Keynote 189
 - Keynote 407
 - Keynote 010
- 1.6.2 Nivolumab
 - Checkmate 017
 - Checkmate 057
- 1.6.3 Durvalumab
 - PACIFIC
- 1.6.4 Atezolizumab
 - Impower 150

- Impower 110
- OAK
- 1.6.5 Nivolumab e Ipilimumab
 - Checkmate 9LA
- 1.6.6 Cemiplimab
 - EMPOWER-Lung 1

1.7 Biomarcadores de respuesta a la inmunoterapia en cáncer de pulmón

- 1.7.1 Microambiente tumoral (TME)
 - 1.7.1.1 Linfocitos T infiltrantes del tumor o TILs
 - 1.7.1.2 Linfocitos T CD4⁺
 - 1.7.1.3 Linfocitos T de memoria
 - 1.7.1.4 Células natural killer (NK)
 - 1.7.1.5 Células NKT (células natural killer T)
- 1.7.2 Grupos inmunes pronósticos

2. Antecedentes, Hipótesis y Objetivos

3. Material y métodos

3.1 Población y tipo de estudio

3.2 Criterios de inclusión

3.3 Criterios de exclusión

3.4 Variables

3.5 Tipo de muestras

- 3.5.1 Procesamiento de las muestras
- 3.5.2 Tinción, paneles de anticuerpos y citometría de flujo

3.6 Tipo de determinaciones

3.7 Análisis estadístico

3.8 Consideraciones éticas

3.9 Conflicto de interés

4. Resultados

4.1 Análisis descriptivo

- 4.1.1 Características de los pacientes y de la enfermedad tumoral
- 4.1.2 Determinaciones en poblaciones de linfocitos
- 4.1.3 Determinaciones en poblaciones de células NK
- 4.1.4 Otras determinaciones

4.2 Análisis de supervivencia

4.3 Análisis inferencial

- 4.3.1 Características de los pacientes y de la enfermedad tumoral
- 4.3.2 Población de linfocitos
- 4.3.3 Población de células NK
- 4.3.4 Otras determinaciones

4.4 Análisis multivariante

5. Discusión

6. Conclusiones

7. Bibliografía

ABREVIATURAS

CP: cáncer de pulmón

CPCP: cáncer de pulmón de célula pequeña

CPM: cáncer de pulmón microcítico

CPNCP: cáncer de pulmón de no célula pequeña

CPNM: cáncer de pulmón no microcítico

TAC: tomografía axial computarizada

RMN: Resonancia magnética

PET-TAC: tomografía por emisión de positrones

EBUS: ecobroncoscopia

EUS: Ecoendoscopia transesofágica

BAG: biopsia de aguja gruesa

PFR: pruebas de función respiratoria

RT: radioterapia

SBRT: radiocirugía esterotóxica

QT: quimioterapia

NK: *natural killer* o células asesinas naturales

NKT: *natural killer T cell* o células asesinas naturalesT

CPA: células presentadoras de antígeno

CD: células dendríticas

TCR: receptor específico de antígeno de células T

Tc: linfocitos T citotóxicos

Granzima B: GzmB⁺

CTLA-4: antígeno citotóxico-4 de linfocitos

PD-1: proteína de muerte celular programada-1

PD-L1: ligando 1 de PD-1

PD-L2: ligando 2 de PD-1

TME: microambiente tumoral

Treg: linfocitos T reguladores

TIM-3: inmunoglobulina de células T y dominio mucina que contiene proteína 3

LAG-3: gen de activación linfocitaria 3

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

HLA: antígenos leucocitarios humanos

SLP: supervivencia libre de progresión

TR: tasa de respuestas

SG: supervivencia global

HR: *hazard ratio*

IC: intervalo de confianza

TRO: tasa de respuestas objetivas

MDSC: células supresoras de células mieloides

TIL: linfocitos infiltrantes de tumores

Tm: linfocitos T de memoria

Th: linfocitos T colaboradores

TIGIT: inmunoglobulina de células T y dominio ITIM

BTLA: atenuador de linfocitos B y T

IL: interleuquina

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

IFN- γ : interferón gamma

TGF- β : factor de crecimiento transformante β

FOXP3: *forkhead box P3*

CD15s: *sialil Lewis X*

TCM: linfocitos T de memoria centrales

TEM: linfocitos T de memoria efectores

TRM: linfocitos T de memoria residentes en tejidos

NLR: ratio neutrófilos linfocitos

ALC: recuento absoluto de linfocitos

RPM: revoluciones por minuto

PBMC: células mononucleares de sangre periférica

PBS: solución salina tamponada con fosfato

FCS: suero fetal bovino

CEICA: Comité de Ética de Investigación de la Comunidad autónoma de Aragón

IMC: Índice de masa corporal

Kg: kilogramos

ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*

RC: respuesta completa

RP: respuesta parcial

EE: enfermedad estable

PR: progresión

DT: Desviación típica

LDH: Lactato deshidrogenasa

ICI: Inhibidores de puntos de control inmune

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología y factores de riesgo del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón (CP) es el segundo tumor más frecuente a nivel mundial, y el primero en hombres, con más de 2 millones de nuevos casos diagnosticados en 2020 (11.4% de todos los tumores), y el que causa mayor mortalidad (18% de todos los tumores) según los datos de GLOBOCAN 2020 (1)

El factor de riesgo más importante para desarrollar un CP es el tabaco. El tabaco puede contribuir a la aparición del 85-90% de los casos de CP en hombres y del 50-80% de los casos en mujeres, y constituye un grave problema de salud pública. Especialmente preocupante es el aumento progresivo del tabaquismo en el sexo femenino, lo que explica el aumento de incidencia del CP en la mujer.

Entre las causas no relacionadas con el tabaco se encuentran las exposiciones ambientales como el asbesto, el arsénico, radón, la polución del aire o las radiaciones ionizantes. Se sabe también que los familiares directos de los pacientes diagnosticados de un CP tienen un 80% más de riesgo de padecerlo, posiblemente asociado a polimorfismos genéticos desconocidos por el momento(2).

1.2 Anatomía Patológica

El CP es una enfermedad muy heterogénea existiendo grandes diferencias clínicas y anatomopatológicas. Globalmente puede dividirse en dos grandes tipos histológicos: el cáncer de pulmón de célula pequeña o microcítico (CPCP o CPM) (15% del total) y el cáncer de pulmón de célula no pequeña o no microcítico (CPNCP o CPNM) (85% del total). A su vez el CPNM se divide en adenocarcinomas (subtipo más frecuente de CP) y escamosos. La incidencia de los tumores escamosos ha experimentado un gran descenso en los últimos años, debido en gran medida a la reducción del hábito tabáquico.

Hasta hace algunos años, el tratamiento del CP se realizaba exclusivamente con fármacos quimioterápicos que se seleccionaban en función de la histología. Sin embargo, cada vez existen mayores avances en el conocimiento de la biología de este tumor, incluyendo su interacción con otros factores del huésped, lo que ha llevado a la incorporación del diagnóstico molecular en la práctica clínica cambiando el paradigma de tratamiento de esta enfermedad.

Dentro de lo que se debería testar a nivel molecular, al diagnóstico del CP, destaca la expresión de PDL-1, la mutación EGFR (presente en un 17% de los casos), BRAF (5%), MET (4%), NTRK (<1%) y KRAS (29%) , los reordenamientos ALK (3%), RET (2%) y ROS-1 (1%) y la sobreexpresión o mutaciones de HER-2 (4%).

Mientras que la expresión de PDL-1 se utiliza como un biomarcador de respuesta al tratamiento inmunoterápico, el resto de mutaciones o reordenamientos definen subtipos específicos con un pronóstico más favorable gracias al tratamiento con terapias dirigidas (3).

1.3 Diagnóstico y estadios

El estudio del CP es un proceso que precisa de la realización de una serie de pruebas complementarias que detallaremos a continuación. El objetivo de este estudio es definir en qué zonas del organismo existe enfermedad tumoral, cuál es su grado de extensión y conseguir una muestra tumoral de calidad que permita un diagnóstico histológico y molecular preciso y completo para poder seleccionar la mejor estrategia terapéutica en cada paciente(4). Las pruebas a realizar son las siguientes:

- Tomografía axial computarizada (TAC) que incluya cortes a nivel cerebral, torácico, abdominal y pélvico. Este estudio nos permite valorar la afectación tanto pulmonar como del resto de órganos a distancia.
- Resonancia magnética (RMN) cerebral: examen sin radiación que utiliza imanes y ondas de radio para crear imágenes del cerebro y de los tejidos nerviosos circundantes con una precisión mucho mayor que el TAC para el diagnóstico de metástasis cerebrales.
- Tomografía por emisión de positrones (PET-TAC): Esta exploración es extremadamente útil para descartar metástasis a distancia, realizar una valoración de los ganglios mediastínicos y confirmar las lesiones sospechosas que generan duda con las imágenes del TAC. Se recomienda realizar en todos los pacientes con tumores operables y reseables antes de una cirugía con intención curativa.
- Broncoscopia: Con este estudio se valora la vía respiratoria a nivel intrabronquial con la intención de descartar lesiones tumorales a esos niveles y conseguir puncionar las lesiones pulmonares que se localicen a nivel central. Es la técnica de elección, necesaria en la práctica totalidad de los pacientes en los que se pretenda un tratamiento quirúrgico, ya que junto a un alto rendimiento diagnóstico histológico proporciona información útil para el tratamiento (reseabilidad quirúrgica), con un aceptable nivel de tolerancia y morbimortalidad.
- Ecobroncoscopia (EBUS): Es una técnica novedosa, segura y escasamente invasiva, que permite realizar un diagnóstico histológico puncionando mediante ecobroncoscopia los ganglios mediastínicos sospechosos sin necesidad de intervenir quirúrgicamente. Consigue el diagnóstico en el 75-85% de los casos.

- Ecoendoscopia esofágica (EUS): Los nódulos pulmonares ubicados en proximidad al mediastino, retrocardiacos, cercanos a grandes vasos o por delante de la columna vertebral pueden resultar de difícil acceso por vía percutánea o broncoscópica. EUS es un método poco invasivo y con baja morbilidad que permite acceder a estas localizaciones.
- BAG (Biopsia de aguja gruesa) guiada por TAC: Es otra técnica para buscar un diagnóstico histológico. Puede ser la primera elección en los tumores periféricos en los que la rentabilidad alcanza el 90%.
- Técnicas quirúrgicas (videotoracoscopia, mediastinoscopia etc): Estos estudios se llevan a cabo si no ha sido posible llegar al diagnóstico histológico mediante las pruebas mencionadas anteriormente o si existen dudas sobre la afectación mediastínica previo a realizar un tratamiento radical.
- Pruebas de función respiratoria (PFR): estudio necesario para valorar la capacidad ventilatoria de los pacientes y decidir si va a haber una buena tolerancia al tratamiento quirúrgico o radioterápico.

Una vez completado el estudio diagnóstico se estadifica a los pacientes según el Estadiaje TNM (8º edición)(5) (Figura 1)(6)

Tx		El tumor primario no puede identificarse
T0		No evidencia de tumor primario
Tis		Carcinoma in situ
T1	T1mi	AC mínimamente invasivo (≤ 3 cm con componente lepidico y ≤ 5 mm de invasión en el diámetro mayor)
	T1a	≤ 1 cm
	T1b	1 – 2 cm
	T1c	2 – 3 cm
T2		3 – 5 cm Cumple alguno de los siguientes: afecta al BP sin invadir la carina; invade pleura visceral; produce atelectasia o neumonitis obstructiva (de parte o del pulmón entero)
	T2a	3 – 4 cm
	T2b	4 – 5 cm
T3		5 – 7 cm Invade alguno de los siguientes: pleura parietal, pared torácica, nervio frénico, pericardio parietal Asocia un nódulo separado en el mismo lóbulo.
T4		> 7 cm Invade alguno de los siguientes: diafragma, mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio recurrente, esófago, cuerpo vertebral, carina. Asocia un nódulo ipsilateral en distinto lóbulo

Nx	No puede asegurarse que haya afectación ganglionar	
N0	No afectación ganglionar	
N1	Afectación ganglionar ipsilateral peribronquial, hiliar o intrapulmonar	
N2	Afectación ganglionar ipsilateral mediastínica y/o subcarinal	
N3	Afectación contralateral (hiliar, peribronquial, intrapulmonar o mediastínica), escaleno o supraclavicular	

M0		No hay metástasis a distancia
M1	M1a	Nódulos pulmonares contralaterales, implantes pleurales o pericárdicos, derrame pleural o pericárdico
	M1b	Metástasis extratorácica única
	M1c	Metástasis extratorácicas múltiples

Figura 1 Estadiaje TNM (8ª edición)

1.4 Tratamiento

El tratamiento del CP va a variar según la subpoblación histológica, presencia o no de alteraciones genómicas oncogénicas y el estadio tumoral en el que nos encontremos. A continuación, vamos a describir de una manera general cual sería la estrategia terapéutica a seguir según si el tumor se encuentra en un estadio precoz (I o II), en un estadio localmente avanzado (estadio III) o avanzado (IV).

Dado lo extenso del tema vamos a centrar nuestra revisión en el CPNM, que es el objeto de nuestro estudio, y más concretamente en aquellos en los que no se detecta ninguna mutación tumoral específica que permita administrar una terapia dirigida.

- 1.4.1 Estadios precoces (I y II)

Menos de un tercio de los pacientes con cáncer pulmón son diagnosticados en estadios I y II.

El tratamiento estándar de los pacientes con CPNM estadio I y II y con un buen estado funcional, es la cirugía. La lobectomía con linfadenectomía hilio-mediastínica constituye el tratamiento quirúrgico estándar, reservando la neumonectomía cuando no sea posible la realización de lobectomía. Resecciones más limitadas como segmentectomías o la resección en cuña se asocian a una mayor tasa de recurrencia local, aunque ya existen datos para resecciones sublobares en tumores de menos de 2 cms (7)

Aproximadamente el 25-30% de pacientes con CPNM se puede intervenir con una intención curativa, con una supervivencia a los 5 años que oscila entre el 25-67%.

En pacientes en los que esté contraindicado el tratamiento quirúrgico por motivos médicos o que rechacen la cirugía, se puede plantear un tratamiento con radioterapia (RT) radical o con radioterapia estereotáxica (SBRT), especialmente en tumores no centrales con un diámetro < 3 cm, consiguiendo tasas de control local del 90% a 5 años.

Aunque el tratamiento quirúrgico es el tratamiento de elección en pacientes con estadio I-II, aproximadamente el 50% de los pacientes intervenidos recaerán: dos terceras partes recaen de forma sistémica y una tercera parte recaen localmente. Es por ello que, tras la valoración anatomopatológica postquirúrgica, se propone un tratamiento adyuvante para aquellos pacientes con criterios de alto riesgo de recidiva(6,8,9).

Entre los años 2003 y 2005, tres estudios aleatorizados (IALT, JBR.10 y ANITA) validaron el papel de la quimioterapia (QT) adyuvante basada en cisplatino en pacientes con cáncer de pulmón resecaado, sobre todo, en estadios patológicos II-III(10-12). En base a la magnitud clínica del beneficio en supervivencia demostrado en estos estudios, la quimioterapia adyuvante con un doblete de platino se ha convertido en el tratamiento estándar de los pacientes intervenidos de CPNM en estadios IB (mayores de 4 cm) II y III (TNM 7ª edición). Se recomienda la administración de 3-4 ciclos, debiendo iniciarse de

4 a 8 semanas tras la cirugía. La mayoría de los ensayos han utilizado vinorelbina como fármaco en combinación con cisplatino y no existen datos suficientes con otros fármacos de tercera generación.

- **1.4.2 Estadio localmente avanzado (Estadio III)**

Más de un tercio de los pacientes con CPNM debutan con enfermedad localmente avanzada. El estadio III constituye un grupo heterogéneo de pacientes definido por distintos subestadios, con diferente localización, extensión y pronóstico de la enfermedad.

Todavía existen muchos aspectos controvertidos dentro del tratamiento del estadio III, dada la heterogeneidad de las poblaciones incluidas en los diferentes estudios. Además, la clasificación del estadio III ha ido cambiando y redefiniéndose a lo largo de los años, se han mejorado las técnicas de RT y se han incorporado esquemas de QT menos tóxicos o más fáciles de administrar.

Aunque se trata de un grupo muy heterogéneo, hoy en día sabemos que todos los subgrupos se benefician de un manejo multidisciplinar que incluya QT y un tratamiento local (cirugía, RT o ambos) y por ello, el manejo de estos pacientes debe ser realizado por un equipo multidisciplinar.

Antes de determinar cuál es la estrategia más adecuada de tratamiento, debemos confirmar, en la mayoría de los casos, la afectación de los ganglios linfáticos del mediastino, dadas las imprecisiones de la estadificación clínica no invasiva (TAC y PET-TAC).

La ausencia de afectación ganglionar mediastínica es uno de los factores más importantes para seleccionar a los pacientes candidatos a cirugía. En aquellos pacientes que, tras la valoración multidisciplinar en el Comité de Tumores, se consideren resecables, deberá realizarse la cirugía. En aquellos potencialmente resecables puede administrarse una QT con un doblete de platino previo a la cirugía, para intentar disminuir la carga tumoral y reseca por completo la enfermedad en el procedimiento quirúrgico.

Para aquellos pacientes con tumores irresecables o potencialmente resecables en los que se decide no optar por un tratamiento quirúrgico, la QT basada en platino y la RT torácica administrados de forma concomitante constituyen el tratamiento estándar. En pacientes frágiles en los que no sea posible la administración de tratamiento concomitante se optará por la administración de QT y RT secuencial o RT sola.

Por el momento se desconoce el esquema de QT óptimo siendo los esquemas más empleados la combinación de un platino (cisplatino o carboplatino) con etopósido,

paclitaxel o vinorelbina. También se acepta la combinación con pemetrexed en histología no escamosa(6,8,9).

Otra estrategia recientemente desarrollada para intentar mejorar el pronóstico de los pacientes con CNMP estadio III irresecable es la incorporación de la inmunoterapia como tratamiento de consolidación tras finalizar la QT-RT. Posteriormente en el apartado de inmunoterapia en CP se desarrollará con más detalle.

Además de lo detallado anteriormente, en el último año se han presentado datos positivos de un estudio fase II en estadio III resecable utilizando la estrategia de combinar QT e inmunoterapia (nivolumab) previo a la cirugía y posterior consolidación con nivolumab tras la misma (13)

- **1.4.3 Estadio avanzando (Estadio IV)**

Más de la mitad de los pacientes con CPNM se diagnostican en estadios avanzados sin opciones de tratamiento potencialmente curativo, con un pronóstico muy desfavorable. Además, una gran proporción de aquellos que presentan enfermedad localizada, acabarán desarrollando metástasis a lo largo de su evolución, por lo que puede afirmarse que más del 80% de todos los pacientes padecen una enfermedad diseminada.

El tratamiento del CPNM avanzado ha evolucionado sustancialmente en la última década, fundamentalmente como consecuencia de un mejor conocimiento de la biología molecular de este tumor y de la incorporación de nuevos fármacos y abordajes terapéuticos, especialmente en determinados subgrupos de pacientes.

El tratamiento del CPNM avanzado va a depender de múltiples factores como son: la histología del tumor, la presencia de marcadores moleculares para terapias dirigidas, contraindicaciones para inmunoterapia, edad, estado funcional, comorbilidades y preferencias del paciente.

Clásicamente el tratamiento de los pacientes con CPNM avanzado en primera línea ha consistido en la administración de QT con un platino (cisplatino o carboplatino) en combinación con otro agente como pemetrexed, docetaxel, vinorebina, gemcitabina o paclitaxel. En los últimos años ha cambiado de forma sustancial el paradigma de tratamiento de estos pacientes gracias a la incorporación de la inmunoterapia y los tratamientos dirigidos, en pacientes con alteraciones moleculares concretas.

A nivel general, y dejando a un margen los pacientes con alteraciones moleculares específicas, el tratamiento de primera línea del CP consiste en un tratamiento con inmunoterapia en monoterapia (si existe alta expresión de PD-L1), y QT con inmunoterapia para el resto (siempre en pacientes sin contraindicaciones a recibir inmunoterapia) (14).

Posteriormente, en líneas sucesivas, suele optarse por un tratamiento en monoterapia dependiendo de los fármacos administrados en primera línea y según histología, considerando inmunoterapia, pemetrexed o docetaxel +/- nintedanib, fundamentalmente (3,6,8,15).

1.5 Inmunología tumoral

En los últimos años se han hecho grandes avances en el campo de la inmunología del cáncer, confirmando la importancia de las células del sistema inmune en el reconocimiento y control del crecimiento tumoral y la aplicación de este conocimiento al desarrollo de terapias basadas en la modulación de la respuesta inmune, la inmunoterapia (16).

A continuación, resumiremos de una manera general, cómo se desarrolla la respuesta inmune celular frente a los tumores, desde la activación inespecífica de la inmunidad innata hasta la generación más selectiva de la respuesta inmune adaptativa, mediada por la presentación antigénica y el reconocimiento tumoral. Seguidamente resumiremos como se regula la respuesta inmune fisiológica y como algunos tumores utilizan estos mecanismos de regulación para escapar de la acción del sistema inmune. Posteriormente, se analizarán más detalladamente las características y funciones principales de las subpoblaciones inmunes más relevantes, que forman parte de este proceso, y que pueden postularse como biomarcadores de respuesta a los tratamientos con inmunoterapia.

Durante la respuesta inmunológica, las primeras células de nuestro sistema inmune en llegar al tumor son las llamadas células inmunes innatas, como las células *Natural Killer* (NK), o las células *Natural Killer T cell* (NKT). Las células NK no sólo son capaces de eliminar a las células tumorales por si solas, si no que, además, promueven la generación de complejos (“cadáveres”) celulares que pueden ser fagocitados por las células presentadoras de antígeno (CPA), como las células dendríticas (CD). Posteriormente, estas CD van a migrar hacia un tejido linfoide periférico para presentar los antígenos fagocitados procedentes de la célula tumoral a los linfocitos T. Entre estos antígenos, se pueden encontrar los denominados antígenos tumorales, que son proteínas del tumor, generalmente no expresadas por células sanas, capaces de ser reconocidas por los linfocitos T.

Una vez en un ganglio linfático, estas CPA que han fagocitado los antígenos tumorales, interaccionan y activan en un primer momento a los linfocitos T CD4⁺ a través de la presentación de péptidos derivados de los antígenos a través del HLA-II. Las células T CD4⁺ van a realizar dos funciones claves en esta presentación antigénica: por una parte, van a facultar a las CD para expresar niveles elevados de CD80 o CD86, a través de la unión de CD40 con su ligando CD40L (un proceso denominado como coestimulación), y por otro lado van a sufrir una expansión clonal con producción de citocinas que va a ayudar a que se produzca posteriormente la expansión y activación de linfocitos T CD8⁺. (Figura 2(17))

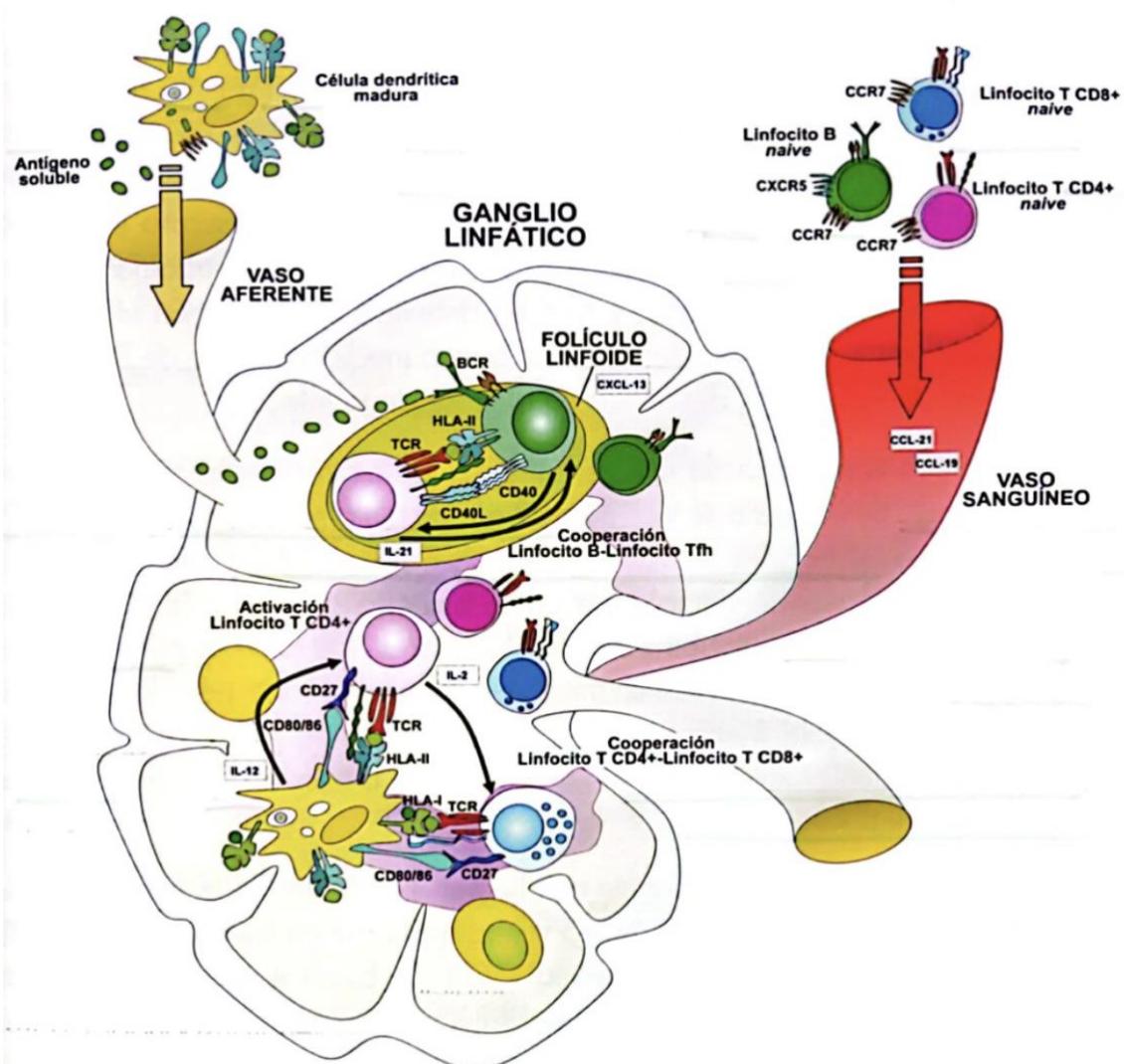


Figura 2 Presentación del antígeno y activación linfocitaria

Junto a la activación de los linfocitos T CD4⁺, el antígeno expresado en la superficie de las CD unido al HLA-I se va unir a los linfocitos T CD8⁺ a través de su receptor específico de células T (TCR) iniciándose la activación y expansión de los linfocitos T CD8⁺, gracias a las citocinas producidas por el linfocito Th1 CD4 así como de otras células. Como cada linfocito T expresa un único TCR, la presencia de millones de linfocitos T en un mismo individuo hace que exista una gran variabilidad de TCR que asegura el reconocimiento de una gran cantidad de antígenos extraños, incluyendo los antígenos tumorales.

Esta activación y expansión del linfocito T CD8⁺ se consigue gracias a tres señales: 1) la unión del TCR con la CD 2) la unión de CD28 (expresado en los linfocitos T) con CD80-86 (expresada en la CD) y 3) la liberación de diferentes citocinas producidas por linfocitos Th1 CD4⁺ (IL-1 e interferón de tipo I) y las propias células dendríticas (IL-12 e IL-15).

Este contacto celular entre CPA y TCR se conoce como sinapsis inmunológica y junto con las citocinas, promueve la conversión de linfocitos T CD8⁺ vírgenes en linfocitos T citotóxicos (Tc) específicos activados por neoantígeno capaces de eliminar las células tumorales. Esto se consigue gracias a la expresión, en estos linfocitos T, de moléculas citotóxicas como la perforina o la granzima B (GzmB) u otras como el ligando de Fas (FasL) (18,19).

Las granzimas son una familia de serín-proteasas que se encuentran principalmente en los gránulos citotóxicos de células NK y linfocitos Tc, aunque también se han detectado en otros tipos celulares, si bien su función en estos últimos no está tan bien caracterizada(20). Las granzimas permanecen inactivas en el interior de los gránulos hasta que los linfocitos Tc se activan y los gránulos citotóxicos liberan su contenido. En este momento, las granzimas acaban accediendo al citosol de las células diana gracias a la acción de la perforina. Una vez allí, mediante la proteólisis de diversos sustratos inducen la muerte celular, principalmente por apoptosis. Existen varias granzimas siendo la tipo B la que tiene un papel más importante en esta inducción de la apoptosis (21). En los últimos años se han descrito otros tipos de muerte celular de carácter inflamatorio inducida por las granzimas como la piroptosis(22). También se ha descrito que algunas granzimas como la gzmA o la gzmK son capaces de regular la respuesta inflamatoria de modo independiente a la muerte celular, estando implicadas en patologías como la sepsis, la colitis ulcerosa o el cáncer colorectal inflamatorio(22)

A pesar de todo este proceso de activación inmunitaria, las células tumorales son capaces de adquirir mecanismos de evasión inmune, fundamentalmente con la expresión de moléculas que inhiben el sistema inmunitario. Estas moléculas son receptores conocidos de modo general como puntos de control inhibitorios del sistema inmune que son expresados por los linfocitos T de manera fisiológica, y se encargan de suprimir la respuesta inmune ante antígenos propios o frente a la flora comensal o microbiota, permitiendo de esta manera, la tolerancia inmunológica. Los más estudiados han sido CTLA-4 (Antígeno citotóxico-4 de linfocitos) y PD-1 (muerte celular programada-1). Las células tumorales usan de modo directo la expresión de los ligandos de estos receptores inhibitorios, para suprimir el sistema inmune y escapar a su control. Además, son capaces de modificar el microambiente tumoral (TME) para rodearse de otras células que expresan estos reguladores lo que les ayuda a evitar la respuesta inmune antitumoral. Uno de los mecanismos más estudiados es la interacción entre PD-1 y sus ligandos PD-L1 o PD-L2 comúnmente expresados a nivel del TME. Dicha unión, inhibe la respuesta inmunológica mediada por linfocitos T y aumenta la producción de linfocitos T CD4⁺ reguladores (Treg) que favorecen a su vez la supresión inmunológica y el descenso de la actividad de los linfocitos Tc y las células NK, introduciendo a las células del sistema inmune en un estado de latencia mantenida que le permite al tumor continuar su crecimiento e invasión (23-25).

En los últimos años, los tratamientos inmunoterápicos más relevantes han tenido como objetivo bloquear la interacción PD-1/PD-L1 y CTLA-4/CD80-86 permitiendo de esta manera reactivar la actividad de los linfocitos Tc. Los anticuerpos monoclonales más utilizados son los anti-PD-1, antiPD-L1 y/o anti-CTLA-4 y el cáncer de pulmón ha sido, como se describe a continuación, una de las localizaciones que mejores resultados ha presentado.

Otros puntos de control inhibidores que conviene destacar son los mediados por los receptores TIM-3 (inmunoglobulina de células T y dominio de mucina que contiene proteína 3) y LAG-3 (gen de activación linfocitaria 3).

TIM-3 es un receptor de membrana que se expresa en células T, células NK, células Treg y algunas células inmunes innatas (macrófagos y CD) donde se ha demostrado que tiene un efecto inhibitor, al interactuar con alguno de sus ligandos como la galectina 9, la fosfatidil-serina o CEACAM1. En ausencia de su ligando, se encuentra unido a una proteína intracelular llamada Bat-3 que impide el desencadenamiento de la actividad inhibitora (26). Este receptor TIM-3 suele encontrarse sobreexpresado en los linfocitos T que se encuentran en estado de latencia por la acción tumoral, y conlleva un peor pronóstico(27).

LAG-3 es un receptor transmembrana del linfocito T muy homólogo a CD4. Aunque ambos se combinan con la molécula del MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) o HLA (como se denomina en humanos) de clase II de la CPA, la interacción con CD4 resulta en una co-estimulación mientras que la de LAG-3 resulta en una inhibición del linfocito T. LAG-3 se expresa de forma constitutiva en células Treg y su presencia es característica de células T latentes o exhaustas por el tumor(26). Aunque el HLA-II es el ligando más estudiado de LAG-3, existen otros como FGL-1, Galectina-3 y L-Sectina.

1.6 Inmunoterapia en cáncer de pulmón

Hasta hace algunos años, la quimioterapia se consideraba el estándar de tratamiento de los pacientes con CP. Poco a poco, se ha ido avanzando en el conocimiento de estos tumores, buscando dianas terapéuticas que permitan realizar un tratamiento más dirigido.

Centrándonos en el CPNM, dentro de los tratamientos inmunoterápicos, están aprobados los fármacos Pembrolizumab (anticuerpo monoclonal humanizado frente a PD-1), Atezolizumab (anticuerpo monoclonal frente a PD- L1), Durvalumab (anticuerpo monoclonal frente a PD- L1), Nivolumab (anticuerpo monoclonal humanizado frente a PD-1), Ipilimumab (anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4) y Cemiplimab (anticuerpo monoclonal frente a PD-1) en diferentes escenarios clínicos.

Durvalumab está aprobado como tratamiento de consolidación tras una respuesta o estabilización al tratamiento locoregional con QT-RT en tumores localmente avanzados.

Pembrolizumab, Atezolizumab, Cemiplimab y Nivolumab/Ipilimumab están aprobados en primera línea de tratamiento metastásico y Nivolumab, Atezolizumab y Pembrolizumab están aprobados en segunda línea de tratamiento metastásico.

En estadios precoces de CPNM, aunque no son el objeto de nuestro estudio, recientemente se han conocido resultados positivos en varios ensayos clínicos de inmunoterapia adyuvante: Nivolumab en el ensayo fase III IMpower010 en pacientes con CPNM completamente resecaado que han recibido QT adyuvante (28); Pembrolizumab en el Ensayo fase III KEYNOTE 091/PEARLS en CPNM completamente resecaado(29); y como tratamiento neoadyuvante Nivolumab combinado con QT en el Ensayo fase III CheckMate 816 (30).

A continuación, vamos a destacar los principales ensayos clínicos que se han realizado con estos fármacos y les han llevado a su aprobación en los estadios III y IV que son el objeto de nuestro trabajo.

- **1.6.1 Pembrolizumab:**

Pembrolizumab fue el primer inmunoterápico que se aprobó en CP. Desde ese momento, los ensayos clínicos más importantes llevados a cabo y que han supuesto una nueva indicación clínica han sido:

- KEYNOTE-024

Estableció el papel de pembrolizumab en monoterapia como tratamiento de primera línea en pacientes con CPNM avanzado sin alteraciones moleculares, que expresaban PD-L1 \geq 50%.

Este estudio aleatorizó a 305 pacientes con CPNM avanzado con expresión de PD-L1 \geq 50% a recibir pembrolizumab en monoterapia (200 mg cada 3 semanas) hasta un máximo de 2 años, frente a 4-6 ciclos de la QT considerada estándar con un doblete de platino.

Con una mediana de seguimiento de 11.2 meses, se objetivó un beneficio en supervivencia libre de progresión (SLP) (10.3 vs 6 m; HR 0.50, IC 95% 0.37-0.68) y en tasa de respuesta (TR) (45% vs 28%). La mediana de duración de respuesta fue de 12.1 y de 5.7 m respectivamente y con un seguimiento de 25 m, se objetivó un aumento de supervivencia global (SG) (30 vs 14.2 m; HR 0.63, IC 95% 0.47-0.86).

En base a estos resultados actualmente pembrolizumab constituye el tratamiento estándar de primera línea en pacientes con CPNM avanzado que expresan PD-L1 \geq 50%(31).

- KEYNOTE-189

Ensayo clínico fase III, que estudió el esquema de combinación de platino con pemetrexed y pembrolizumab.

Aleatorizó a pacientes con CPNM avanzado de histología no escamosa, sin mutación conocida y con independencia de la expresión de PDL1 a recibir tratamiento de QT con cisplatino o carboplatino + pemetrexed + pembrolizumab (200 mg cada tres semanas) o placebo cada 3 semanas por 4 ciclos, seguido de mantenimiento hasta 35 ciclos con pemetrexed + pembrolizumab o pemetrexed + placebo.

Se demostró un beneficio significativo en SLP(HR: 0.52, IC 95% 0.43-0.64) y en SG en el brazo de pembrolizumab, con independencia de la expresión de PD-L1.

En base a este estudio, pembrolizumab en combinación con QT con platino y pemetrexed está aprobado como tratamiento de primera línea en CPNM avanzado no escamoso con independencia de la expresión de PD-L1.

A pesar de ello en la práctica clínica únicamente está financiado para aquellos pacientes con expresión de PD-L1 inferior al 50%, ya que en valores superiores, el estándar es el tratamiento con Pembrolizumab en monoterapia tal y como se ha comentado en el estudio previo(32).

- KEYNOTE-407

Dado que el tratamiento con Pemetrexed no ha demostrado eficacia en los pacientes con carcinomas escamosos, existen otras combinaciones de quimioterapia con pembrolizumab estudiadas para este escenario, esta vez con el esquema de Carboplatino + Paclitaxel.

Este ensayo clínico fase III aleatorizó a pacientes con CPNM avanzado con histología escamosa a recibir QT con carboplatino + paclitaxel cada 3 semanas (o con nab-paclitaxel semanal) en combinación con placebo o pembrolizumab 4 ciclos seguido de placebo o pembrolizumab de mantenimiento cada 3 semanas hasta un máximo de 35 ciclos.

La combinación de QT y pembrolizumab se asoció a una mayor TR (58.4% vs 35%, $p=0.0004$) y a una mayor SG (15.9 m vs 11.3 m, HR 0.64, $p=0.0008$).

El beneficio en SG se produjo independientemente de la expresión de PD-L1 (PD-L1 < 1%: HR 0.61, PD-L1 1-49%: HR 0.57, PD-L1 \geq 50%: HR 0.64).

En base a este estudio pembrolizumab en combinación con carboplatino y paclitaxel o nab-paclitaxel está aprobado como tratamiento de primera línea en CPNM avanzado de histología escamosa(33).

- KEYNOTE-010

Este ensayo fase III comparó pembrolizumab (2 mg/Kg ó 10 mg/Kg cada 3 semanas) versus docetaxel 75 mg/m² cada 3 semanas en 1034 pacientes con CPNM de cualquier histología, que habían progresado a una primera línea de quimioterapia basada en platino. En este estudio sólo se incluyeron pacientes con expresión de PD-L1 \geq 1% por inmunohistoquímica.

Pembrolizumab demostró superioridad frente a docetaxel en términos de SG, con un HR de 0,71 (IC 95% 0,58-0,88) y medianas de SG de 10,4 meses y 8,5 meses para pembrolizumab y docetaxel respectivamente.

También se dispone de datos de SG a dos años siendo de 14.5% para docetaxel y de 30.1% para pembrolizumab. La tasa de respuestas objetivas (TRO) de los pacientes tratados con pembrolizumab fue del 18%, el doble que en el brazo control (9,3%).

El beneficio en supervivencia se observó en todos los pacientes, aunque fue superior en aquéllos con mayor sobreexpresión de PD-L1 (1% vs $>$ 50%).

En base a estos datos, pembrolizumab en monoterapia está aprobado para el tratamiento del CPNM, localmente avanzado o metastásico en segunda línea tras progresión a quimioterapia, en pacientes con expresión de PD-L1 \geq 1%(34).

- 1.6.2 Nivolumab

Dos ensayos pivotaes fase III, uno en pacientes con tumor de histología no escamosa (CheckMate 057) y otro en tumores de histología escamosa (CheckMate 017), han establecido la eficacia de nivolumab en segunda línea. En ambos ensayos los pacientes se incluyeron independientemente de la expresión de PD-L1.

o Checkmate 017

Este estudio comparó nivolumab (3 mg/kg cada 2 semanas) versus docetaxel en 272 pacientes con CPNM con histología escamosa, que habían progresado a una primera línea de quimioterapia basada en platino.

La mediana de SG en el brazo de nivolumab fue de 9,23 meses, superior a la alcanzada en el brazo control (6,01 meses), con una HR de 0,59 (IC 95% 0,44-0,79, $p < 0.001$).

La TRO fue del 20% frente al 8.8% alcanzada con docetaxel.

En cuanto a la SLP, las medianas en los brazos experimental y control fueron 3,48 meses y 2,83 meses respectivamente (HR 0,62 [IC 95% 0,47-0,81]).

No hubo diferencias de eficacia en base al nivel de expresión de PD-L1(35)

o CheckMate 057

En este ensayo, 582 pacientes con CPNM avanzado de histología no escamosa y previamente tratados, fueron aleatorizados a recibir nivolumab versus docetaxel.

Nivolumab demostró superioridad frente a docetaxel en términos de SG, con una HR de 0,73 (IC 95% 0,59-0,89, $P = 0.002$) y una mediana de SG de 12,19 meses vs. 9,36 meses con quimioterapia.

Recientemente se han presentado los datos de SG a 2 años, confirmando dichos resultados (SG a 2 años: 23% vs 8%).

La TRO fue también superior en los pacientes tratados con nivolumab (19,2% vs. 12,4%) y las respuestas fueron más duraderas (17,15 meses vs. 5,55 meses). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en SLP (HR 0,92 [IC 95% 0,77-1,11]).

Sin embargo, en contra de los resultados del Checkmate 017, los pacientes con mayor nivel de expresión PD-L1 ($\geq 10\%$), experimentaron tanto una TRO (37,2%) como una SG (19,4 meses [IC95% 15,2, NA]) mayores con nivolumab, en comparación con docetaxel (12,7%, 7,95 meses [IC95% 6,3-10], respectivamente).

Por otro lado, en aquellos pacientes con bajo o nulo nivel de expresión PD-L1 ($< 1\%$), no se observaron diferencias en SG con nivolumab respecto a docetaxel (10,4 meses [IC95% 7,2-14,1] y 10,9 meses [IC95% 7,4-11,9], respectivamente)(36).

En base a los datos de estos dos estudios, nivolumab en monoterapia está aprobado para el tratamiento del CPNM metastásico después de quimioterapia previa, independientemente de la expresión de PDL1.

- 1.6.3 Durvalumab

Otra estrategia recientemente desarrollada para intentar mejorar el pronóstico de los pacientes con CPNM es intentar introducir la inmunoterapia en estadios localmente avanzados como terapia de consolidación tras conseguir una respuesta con el tratamiento estándar con QT-RT.

○ PACIFIC

En este estudio 700 pacientes con CPNM estadio III irresecable sin progresión tras la administración de al menos dos ciclos de QT basada en platino concurrente con RT fueron aleatorizados 2:1 a recibir durvalumab cada 2 semanas durante 12 meses o placebo.

Con una mediana de seguimiento de 25 meses se objetivó un incremento en SLP con durvalumab con una mediana de 17.2 frente a 5.6 m con placebo, HR (0.51, IC 95% 0.41-0.63) y en SG (HR 0.68, IC 95% 0.54-0.86).

El beneficio en SLP y SG con durvalumab se objetivó tanto en pacientes con PDL1 > 25% como en pacientes con PDL1 < 25%. Sin embargo, en un análisis exploratorio se objetivó beneficio en SLP con durvalumab pero no en SG en pacientes con expresión de PDL1 < 1 %, por lo que la aprobación queda limitada a aquellos pacientes con expresión de PD-L1 > 1%(37).

En 2022 se han actualizado los datos de SG tras un seguimiento de 5 años. La mediana de SG es de 47.5 m vs 29.1 m (HR 0.72, 95% CI 0.59–0.89) y la de SLP de 16.9m vs 5.6 m (HR 0.55, 95% CI 0.45–0.68)(38).

Por todo ello, el tratamiento con Durvalumab durante un año está aprobado para aquellos pacientes con estadio III irresecables que hayan sido tratados con QT-RT sin progresar y tengan una expresión de PD-L1 > 1%.

- 1.6.4 Atezolizumab

Atezolizumab ha obtenido resultados prometedores en varios ensayos clínicos que detallaremos a continuación:

○ IMpower 150

Este estudio aleatorizó 1202 pacientes con CPNM avanzado con histología no escamosa (no selección por PD-L1), a recibir QT con carboplatino + paclitaxel combinado con: atezolizumab (rama A), atezolizumab más bevacizumab (rama B) o bevacizumab (rama C).

Se objetivó una mayor SLP y SG entre los pacientes de la rama B con respecto a los de la rama C. La SLP fue de 8.3 vs 6.8 m respectivamente (HR 0.59, IC 95% 0.50-0.70). La SG fue de 19.2 vs 14.7 m (HR 0.78, IC 95% 0.64-0.96, $p = 0.02$)(39).

Los resultados de este estudio hacen que la combinación de QT con carboplatino + paclitaxel + bevacizumab + atezolizumab sea una opción de tratamiento de primera línea en pacientes con CP de histología no escamosa.

- IMpower 110

El estudio fase III IMpower 110 mostró que la monoterapia con atezolizumab mejoraba la SG de los pacientes con CPNM avanzado con alta expresión de PD-L1 en comparación con quimioterapia sola.

Se aleatorizaron 572 pacientes, la mediana de SG del grupo de altos expresores de PDL-1 en tratamiento con atezolizumab fue de 20.2 meses frente a 13.1 en el grupo de quimioterapia ($p=0.01$)(40)

- OAK:

En este estudio de segunda línea de tratamiento, 850 pacientes con CPNM avanzado previamente tratados con una o dos líneas de QT fueron aleatorizados a recibir atezolizumab versus docetaxel.

Atezolizumab demostró superioridad en términos de SG frente a docetaxel en pacientes con CPNM metastásico tras progresión a una primera línea de tratamiento, con una ganancia en la mediana de SG de 4,2 meses, 13.8 vs 9.6 meses (HR 0,73 [IC 95% 0,62-0,87]). El beneficio de atezolizumab sobre la quimioterapia se observa aproximadamente a partir de los 3 meses, momento en que las curvas de supervivencia se separan.

Las tasas de respuesta, en cambio, fueron similares en ambos brazos de tratamiento (14% con atezolizumab y 13% con docetaxel), si bien las respuestas fueron más duraderas con atezolizumab (13,6 meses vs. 6,2 meses).

Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en la SLP, incluso la mediana de SLP fue superior en el brazo control (4 meses vs. 2 meses), aunque a partir de los 6 meses el beneficio en términos de SLP también parece mayor con atezolizumab.

El beneficio de atezolizumab sobre la quimioterapia se observa en todos los subgrupos analizados de acuerdo con el nivel de expresión de PD-L1 (medido no sólo en la célula tumoral sino también en las células inmunes que infiltran el tumor), incluso en el subgrupo de pacientes (45%) con una baja o nula expresión de PD-L1 ($< 1\%$). Cabe señalar, no obstante, que este beneficio aumenta a medida que lo hace la expresión del biomarcador, siendo mayor en aquellos pacientes con una expresión de PD-L1 $\geq 10\%$ donde se alcanzaron medianas de SG de 20,5 meses con atezolizumab vs. 8,9 meses con docetaxel (HR 0,45 [IC 95% 0,27-0,64]), lo que supone un incremento de 11,6 meses en la mediana de SG(41).

En base a estos datos, atezolizumab en monoterapia está aprobado para el tratamiento del CPNM metastásico después de quimioterapia previa, independientemente de la expresión de PD-L1.

1.6.5 Nivolumab e Ipilimumab

La combinación de estos dos inmunoterápicos se ha estudiado en primera línea de tratamiento, en el ensayo que detallaremos a continuación.

- CHECKMATE 9LA:

Ensayo clínico fase III multicéntrico que aleatorizó a 719 pacientes con CPNM estadio IV en primera línea de tratamiento a recibir nivolumab (360 mg iv cada 3 semanas) e ipilimumab (1 mg/kg iv cada 6 semanas) combinado con un doblete de platino (iv cada 3 semanas por 2 ciclos) frente a la QT sola (iv cada 3 semanas por 4 ciclos).

Los datos del primer análisis realizado muestran una mejoría en la SG 15.6 meses (IC 95% 13.9–20) en el grupo experimental vs 10.9 meses (9.5–12.6) en el grupo control (HR 0.66 [CI 95% 0.55–0.80]).(42)

Por ello la combinación de Nivolumab e Ipilimumab junto con 2 ciclos de QT está aprobada como tratamiento de primera línea en CPNM.

1.6.6 Cemiplimab

Cemiplimab es un anticuerpo monoclonal anti PD-1 que recientemente ha demostrado beneficio de supervivencia como tratamiento de primera línea en CPNM

- EMPOWER-Lung 1:

Ensayo clínico fase III multicéntrico que aleatorizó a 710 pacientes con CPNM estadio IV en primera línea de tratamiento a recibir cemiplimab 350 mg cada 3 semanas frente a un doblete de platino. Se permitió el *crossover* a la rama de Cemiplimab tras progresión a la QT.

En el grupo con expresión de PD-L1 de al menos el 50 %, que constaba de 563 pacientes, no se ha alcanzado por el momento la mediana de SG (IC 95% 17.9–no evaluable) con cemiplimab (n=283) versus 14.2 meses (11.2–17.5) con QT (n=280; [HR] 0,57 [0,42–0,77]; p=0.0002). La mediana de SLP fue de 8,2 meses (6,1–8,8) con cemiplimab versus 5.7 meses (4.5–6.2) con QT (HR 0.54 [0.43–0.68]; p<0.0001)(43).

Por los buenos resultados previamente mostrados, Cemiplimab en monoterapia ha conseguido su aprobación en primera línea de tratamiento para pacientes con CPNM con expresión de PD-L1 mayor o igual a 50%.

1.7 Biomarcadores de respuesta a la inmunoterapia en cáncer de pulmón

A pesar del enorme potencial de la inmunoterapia, aún existen dificultades para conocer y seleccionar aquellos pacientes que van a responder al tratamiento, ya que no todos los pacientes ni todos los tumores responden de la misma manera.

Actualmente, el único biomarcador con utilidad clínica para la inmunoterapia es la expresión de PD-L1, e incluso éste, a pesar de haber sido estudiado en múltiples ensayos clínicos, no es completamente preciso y presenta varias limitaciones. Existen ocasiones en las que la expresión de PD-L1 no se correlaciona con la respuesta y a pesar de una alta expresión, los pacientes no responden a la inmunoterapia y al revés. Además, PD-L1 es un marcador muy heterogéneo y cambiante tanto en el tejido tumoral analizado como a lo largo del tiempo, pudiendo tener distintas determinaciones según la zona de tumor analizada y según el momento en el que realizamos el análisis tumoral. Todo ello, unido a la variabilidad de técnicas inmunohistoquímicas existentes para su uso aumentan la heterogeneidad de sus resultados (44-49).

En los últimos años los estudios en inmunoterapia se han enfocado en encontrar biomarcadores de respuesta predictiva para anticipar qué pacientes responderán a cada tipo de tratamiento, evitando toxicidades innecesarias y reduciendo costes(50).

Un gran número de estos estudios han explorado la posibilidad de que los diferentes tipos de células inmunes presentes en el TME y su distribución en sangre periférica puedan contribuir a predecir una buena respuesta a la inmunoterapia frente al CP.

- 1.7.1 Microambiente tumoral (TME):

El TME está formado por células del sistema inmune muy diversas entre las que se encuentran macrófagos, células T, células B, CD, células NK, células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) y neutrófilos, entre otras.

En los últimos años, se han desarrollado múltiples estudios sobre TME demostrándose que sus diversos componentes participan activamente en varios procesos tumorales e influyen ampliamente en la iniciación tumoral, así como en su progresión maligna, diseminación o respuesta a terapias dirigidas. Todo ello es debido a la existencia de un estado de inmunosupresión en el TME que se consigue con múltiples mecanismos, como

la inadecuada presentación de antígenos, la secreción de citocinas inhibitorias o el reclutamiento de células del sistema inmune con capacidad inhibitoria(51).

Por ello, todos los componentes del TME, representan un poderoso y potencial instrumento que puede llevarnos a entender mejor cómo se inhibe la respuesta inmunológica y a encontrar biomarcadores de respuesta a los tratamientos con inmunoterapia.

Según los últimos estudios, uno de los factores más importantes implicados en la modulación de la inmunidad del cáncer en TME son los TIL (linfocitos infiltrantes de tumores), especialmente las células Tc, las células T de memoria (Tm) tanto CD4⁺ como CD8⁺ y las células T CD4⁺ cooperadoras o *helper* (Th)(52).

1.7.1.1 Linfocitos infiltrantes del tumor o TILs

Los linfocitos T suponen del 60 al 80% de los linfocitos circundantes y presentan en su superficie el receptor específico de antígeno TCR. En virtud de su función y el correceptor que expresan en su superficie, se distinguen dos tipos principales de linfocitos T:

- Linfocitos T CD4⁺, también llamados linfocitos Th.
- Linfocitos T CD8⁺, también llamados linfocitos Tc.

Los linfocitos T CD8⁺ presentan un TCR que se asocia a la molécula del HLA clase I presente en la casi totalidad de las células del organismo. Su principal función es detectar y destruir las células diana infectadas por virus u otros microorganismos intracelulares y células tumorales (53).

Dentro del TME existen múltiples células del sistema inmune, siendo los TIL una de las poblaciones más importantes. Múltiples estudios han demostrado la importancia de los TIL y cómo se correlacionan con la destrucción tumoral y con mejores respuestas a la inmunoterapia. Los TIL se consideran una población seleccionada de células T con una reactividad inmunológica específica más alta contra las células tumorales que los linfocitos no infiltrantes. Entre los TIL, las células T CD8⁺ activadas por neoantígeno son una de las poblaciones celulares más relevantes, ya que tienen el potencial de reconocer y eliminar las células cancerosas(54).

El desarrollo del cáncer se caracteriza por la acumulación de un número variable de alteraciones genéticas en las células del organismo y la pérdida de procesos naturales de regulación del ciclo celular. Estas alteraciones pueden propiciar la aparición de neoantígenos o la expresión de antígenos de diferenciación de la línea germinal que podrán ser presentados en la superficie celular unidos a moléculas de HLA distinguiéndose de las células normales. Estos complejos pueden ser reconocidos por los linfocitos T permitiendo la eliminación de la célula tumoral. Sin embargo, a veces, a pesar de que el sistema inmune reconoce al tumor y lo combate, no es capaz de eliminarlo por completo, llegando a una situación de equilibrio o latencia en la que el

tumor aunque persiste, no crece de forma descontrolada(55). Esto ocurre debido a que, a pesar de existir una respuesta específica de células T CD8⁺ reactivas, las células tumorales provocan, de forma concomitante, un aumento en algunos mecanismos inmunosupresores dentro del TME, como la expresión de los puntos de control inmunitarios PD-1, CTLA-4, Tim-3 y LAG-3 en TIL. Este equilibrio entre tumor y sistema inmune, que puede durar muchos años, puede romperse en cualquier momento a favor del crecimiento del tumor por una inestabilidad genética o por la aparición de mutaciones, permitiendo de esta manera, el escape tumoral.

Los inhibidores de PD-1/PD-L1 o CTLA-4 bloquean la vía de señal reguladora negativa y liberan a las células T de este estado de equilibrio previamente mencionado, permitiendo que eliminen de manera definitiva las células tumorales. Por tanto, no es de extrañar que una mayor expresión de PD-1 y CTLA-4 en los linfocitos se correlacione con una mejor respuesta a la inmunoterapia(56,57).

También se está estudiando si esta misma relación existe con otros receptores inhibitorios como LAG-3, TIM-3 y TIGIT. En un reciente metaanálisis, se reportó que una alta expresión de LAG-3 se asociaba con una mejor SG en diferentes tipos de tumores(58). Sin embargo, en los últimos años han aparecido nuevas técnicas de análisis unicelular multiparamétrico con los que se ha podido observar que la expresión de marcadores como PD-1, LAG-3 y TIM3 tiene distintas distribuciones y funciones(59).

Datar et al estudiaron 90 pacientes con CPNM en tratamiento con anti-PD-1 y observaron que PD-1 y LAG-3 se localizaban predominantemente en células T o células NKT, mientras que la expresión de TIM-3 era mayor en células NK y macrófagos. La coexpresión de PD-1, LAG-3 y TIM-3 se asociaba con una activación prominente de células T con función efectora (Gzmb⁺). A su vez, LAG-3 y TIM-3 estaban presentes en subconjuntos de TIL que carecían de expresión de PD-1 pero mostraban un perfil funcional distinto y existía otro subconjunto con únicamente LAG-3 elevado que se asociaba significativamente con una SLP más corta(60).

En esta línea, Thommen y colaboradores describieron las propiedades de las células T con diferentes niveles de expresión de PD-1 en CPNM y su posible relación con el control tumoral mediado por el sistema inmune (56). Sus datos mostraron que los TIL CD8⁺ con niveles de PD-1 que superan los observados en controles sanos, presentan diferencias moleculares, metabólicas y funcionales en relación con aquellas con expresión normal o negativa de PD-1. Todas estas diferencias indicaban que estas células T CD8⁺ con alto contenido de PD-1 poseen una capacidad antitumoral directa y una capacidad para reclutar otras células inmunes que median en la respuesta inmunitaria antitumoral, lo cual las posicionan como una de las células más importantes involucradas en el reconocimiento de tumores.

Con base en estos datos, los autores realizaron un análisis retrospectivo de biopsias previas al tratamiento de 21 pacientes con CPNM en estadio IV sometidos a terapia anti-PD-1, lo que reveló una clara correlación entre la presencia de estas células T CD8⁺ PD-1⁺, la respuesta al tratamiento y la SG (HR 0,16, p <0,05)(54,56,61).

En este contexto, existen algunos ensayos clínicos que exploran esta posibilidad con resultados prometedores. Se ha observado que la presencia de un alto porcentaje de TIL PD-1⁺ CD8⁺ en el TME de pacientes con CPNM previamente a iniciar tratamiento con durvalumab tuvo una mejor TR (37 frente a 7%), mejor SG (24,3 frente a 6,5 m) y mejor SLP (7,3 frente a 2,6 m) en comparación con aquellos pacientes con bajo porcentaje de TIL PD-1⁺ CD8⁺(62).

Otro ensayo clínico con atezolizumab en CPNM obtuvo resultados similares con una mejor TR (43% vs 8%) y SLP (6,8% vs 2,8%) en pacientes con alta presencia de células PD-1⁺ CD8⁺ en TME(63).

Todos estos estudios confirman hallazgos previamente descubiertos en otros tipos de tumores, como el melanoma, y muestran que la expresión de PD-1 en TIL CD8⁺ en biopsia tumoral define una población de linfocitos reactivos y con altas capacidades antitumorales(64,65).

1.7.1.2 Linfocitos T CD4⁺

En los linfocitos T CD4⁺ su TCR está asociado a la molécula de superficie CD4 y reconocen péptidos asociados a las moléculas del HLA de clase II presentes en las CPA. La función de los linfocitos T CD4⁺ es clave en la respuesta inmunitaria adaptativa, ya que coordinan la generación de la respuesta más adecuada en función del tipo de microorganismo invasor y la puerta de entrada según el tipo de patógeno. Tras su activación los linfocitos T CD4⁺ secretan citocinas que pueden estimular a la práctica totalidad de las células del sistema inmunitario(53).

Analizando su función, los linfocitos T CD4⁺ se clasifican globalmente en dos subconjuntos principales: los linfocitos Th con actividad cooperativa y los linfocitos Treg que participan en la regulación del sistema inmune inhibiéndolo y evitando una respuesta excesiva. Dentro de los Th se ha observado que existen subpoblaciones que pueden diferir en las citocinas que expresan y en la función que desempeñan.

El subconjunto Th1 es el más destacado para la inmunidad antitumoral y sus células ayudan a la diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ mediante la producción de citocinas como IFN- γ e IL-2. Además, la señalización mediada por Th1 promueve el establecimiento de una línea de linfocitos T CD8⁺ de memoria de larga duración junto con la activación de respuestas antitumorales innatas dependientes de células NK.

Otras subpoblaciones Th son las Th2 y Th17 que se han asociado generalmente con la progresión tumoral. Sin embargo, varios estudios recientes también muestran lo contrario. Las células efectoras Th2 podrían ser necesarias para establecer respuestas de memoria antitumorales a largo plazo y las Th17 podrían producir respuestas antitumorales mediante la expresión de IFN- γ , permitiendo el reclutamiento de células efectoras en el TME. Es probable que esta "dualidad de respuestas" dependa del contexto(66-68).

Las células Treg, por el contrario, contribuyen de modo clave a la tolerancia tumoral, al suprimir las otras poblaciones de células inmunes por contacto de célula a célula o con la producción de citocinas antiinflamatorias, incluidas IL-10 y TGF (factor de crecimiento transformante)- β .

Se ha demostrado ampliamente que las células Treg mediante la expresión de PD-L1, entre otros medios, inhiben la función antitumoral de las CD, células T o células NK(69). En este contexto, se ha demostrado recientemente que los pacientes con CPNM con alta concentración de linfocitos T CD8⁺ PD-1^{high} y de Treg CD4⁺ PD-L1^{high} presentan una mejor respuesta clínica durante el tratamiento anti-PD-1(70,71).

Dentro de los subconjuntos de células Treg, se han utilizado diferentes marcadores para caracterizar su fenotipo y funcionalidad. FOXP3 (*Forkhead box P3*) es el factor de transcripción central que regula el desarrollo y la función de CD4⁺ Treg y suele ser el que más comúnmente se analiza a la hora de detectar poblaciones de linfocitos TCD4⁺.

Sin embargo, la expresión de FOXP3 en las células T y su impacto sigue siendo controvertida. Algunos estudios han demostrado que la expresión de FOXP3 se observa en células T activadas sin actividades reguladoras, mientras que otros indican que se asocia principalmente a células T con actividades reguladoras(72,73). Existe una evidencia acumulada de que las células T FOXP3⁺ son heterogéneas en fenotipo y función formando subpoblaciones supresoras y no supresoras. Si únicamente se mide FOXP3 para diferenciar Treg y definir las como células T con actividad reguladora, se corre el riesgo de clasificarlas incorrectamente, seleccionando algunas células T FOXP3⁺ con actividad cooperativa. Esto puede conducir a resultados contradictorios al evaluar estas células como marcadores de respuesta a la inmunoterapia. De hecho, las células T FOXP3⁺ CD4⁺ se pueden dividir en tres subpoblaciones según los niveles de expresión (*en inglés high o low*) de FOXP3, CD25 y CD45RA:

- 1) células FOXP3^{low}CD45RA⁺ CD25^{low}, designadas como células Treg vírgenes o en reposo.
- 2) células FOXP3^{high}CD45RA⁻ CD25^{high}, designadas como células efectoras o Treg activadas.
- 3) células FOXP3^{low} CD45RA⁻ CD25^{low}, designadas como no Treg, que no poseen actividad supresora pero pueden secretar citocinas proinflamatorias.

Además, las poblaciones del grupo 2 altamente supresoras (células FOXP3^{high} CD45RA⁻ CD25^{high}) y del grupo no supresor 3 (células FOXP3^{low} CD45RA⁻ CD25^{low}) pueden diferenciarse mejor por la expresión de CD15s (*sialil Lewis x*), un antígeno de azúcar presente en los Treg supresores, al menos para aquellas células ubicadas en sangre periférica(74).

Con respecto a esta caracterización funcional, recientemente se publicó un estudio en el que se encontró que el subconjunto de células Treg con mayor actividad

inmunosupresora se caracteriza por una expresión alta de CD25 y una expresión baja de CD127 lo que podría facilitar su caracterización en muestras derivadas de pacientes.

Por lo tanto, es crucial evaluar la heterogeneidad de las células T FOXP3⁺ en los tejidos tumorales para evaluar su contribución a la respuesta inmune antitumoral.

En esta línea, la acumulación de estudios ha demostrado que una gran cantidad de células Treg y una proporción reducida de células T CD8⁺ infiltrantes de tumores frente a células Treg FOXP3⁺ se correlacionan con un mal pronóstico en diferentes tipos de cáncer, incluido el CPNM(73-75).

Sin embargo, cabe señalar que, según un metaanálisis realizado en 2011, la relación cuantitativa entre diferentes poblaciones de células inmunes en la TME podría ser más significativa que su mera presencia(76,77).

De hecho, se encontró que una alta proporción de células CD4⁺Treg / CD8⁺ T indicaba un mal pronóstico en pacientes con CPNM(75,78). Así mismo, Uryvaev et al observaron que los pacientes con una proporción de CD8⁺ / CD4⁺ en TME menor de 2 tenían una tasa de respuesta del 13,3% (p: 0,046) en el CPNM metastásico tratado con anti-PD-1, mientras que, si era mayor de 2, la tasa de respuesta ascendía al 43-50% (p: 0,038)(79).

1.7.1.3 Linfocitos T de memoria

La respuesta inmune mediada por linfocitos T da como resultado la generación de una población persistente de células T con memoria inmunológica contra el antígeno presentado por las CPA. Por lo general, una vez eliminada la infección o el antígeno tumoral, la mayor parte de los linfocitos generados serán eliminados física o funcionalmente. Sin embargo, una pequeña proporción de linfocitos permanecerán, constituyendo las células de memoria.

La caracterización de los linfocitos de memoria y las diferentes subpoblaciones se basa en la expresión de diversos marcadores de superficie y en función de éstos, son varias las poblaciones de linfocitos T de memoria (tanto CD4⁺ como CD8⁺) que se han identificado, siendo las tres siguientes las mejor caracterizadas(18):

- Linfocitos T de memoria centrales (TCM): se caracterizan por expresar la isoforma RO de CD45 y el receptor de quimiocinas CCR7. Gracias a la expresión de este último, pueden recircular sucesivamente desde los órganos linfoides a la circulación sistémica y son capaces de autorrenovarse en los órganos linfoides secundarios.
- Linfocitos T de memoria efectores (TEM): también expresan CD45RO pero no expresan CCR7, lo que hace que se encuentren en circulación sistémica y tejidos periféricos sin acudir a los ganglios linfáticos a renovarse.

- Linfocitos T de memoria residentes en tejido (TRM): se encuentran en tejidos periféricos sin recircular por la sangre y constituyen la primera barrera de defensa frente a nuevas exposiciones. Se caracterizan por presentar altos niveles de CD69.

Por todo lo relatado anteriormente, se espera que los tumores potencialmente antigénicos, como el melanoma o el CPNM, capaces de desencadenar una respuesta inmune del huésped durante su desarrollo y progresión, sean también capaces de generar una memoria inmune contra esos antígenos tumorales.

Tal y como se ha descrito previamente con los linfocitos T efectores, las células T de memoria también son inhibidas por el sistema de regulación inmune mediado por PD-1, lo que explica en parte la respuesta inmune ineficaz que se produce en los pacientes con tumores activos. En este contexto, se han diseñado estudios para explorar la posibilidad de que la proporción de células T de memoria pueda tener una correlación con la respuesta a la inmunoterapia.

Al explorar los diferentes tipos de células T, Ribas et al llevaron a cabo un estudio en el que examinaron biopsias de pacientes con que estaban en tratamiento con pembrolizumab, encontrando un aumento de células T de memoria ($CD8^+ / CD4^- / CD45RO^+$) en pacientes que hacían una buena respuesta al pembrolizumab(80).

En esta línea y tal y como se ha detallado previamente, se identificó una nueva población de células T $CD8^+$ de memoria llamadas células TRM que podrían desempeñar un papel clave en la inmunovigilancia tumoral y la respuesta a la inmunoterapia(81,82). Estas células se caracterizan por permanecer en el tejido local en el que se ha desarrollado la presentación antigénica, sin recircular por la sangre. Este subconjunto se define por la expresión de $CD103^+$, $CD49a^+$ y $CD69^+$ y se ha observado en TIL de cáncer de pulmón, así como en otros tumores(83,84).

Entre sus propiedades, las células TRM expresan altos niveles de moléculas citotóxicas y responden más rápidamente a la reexposición al antígeno tumoral que las células de memoria circulantes(82).

Al igual que el resto de células del sistema inmune, las células TRM pueden estar inhibidas en el TME por la inducción de receptores inhibidores de células T, incluidos PD-1 y TIM-3. Existen, además, datos preliminares que muestran la capacidad de estos linfocitos TRM para expandirse rápidamente durante el tratamiento con anti-PD-1, pudiendo convertirse en un biomarcador prometedor(85).

Recientemente, Clarke et al estudiaron los TRM en pacientes con CP e identificaron un subconjunto de $Tim-3^+ IL-7R^-$ TRM presente exclusivamente en tumores que expresaban altos niveles de PD-1. Estas células pueden ser uno de los objetivos celulares de la terapia anti-PD-1 y las diferencias en la magnitud de esta población de TRM podrían ser una explicación de la variación en la respuesta clínica a los inhibidores de PD-1(86).

En este sentido, otro estudio demostró que una alta infiltración del subconjunto CD103⁺ CD8⁺ TRM TIL en pacientes con CPNM en estadios precoces se correlacionaba con una mejor supervivencia(87). Además, este estudio mostró una correlación positiva entre la infiltración tumoral por CD103⁺ TIL, independientemente de la ubicación epitelial y/o estromal, y la SLP del paciente con CPNM.

Por todo ello, la medición de esta subpoblación de células T de memoria en TME podría ser un biomarcador interesante con resultados prometedores.

1.7.1.4 Células Natural killer (NK)

Las células NK constituyen aproximadamente el 5-15% de los linfocitos circundantes. Son células del sistema inmune innato, que a diferencia de los linfocitos T no precisan de una presentación antigénica y pueden inducir directamente la muerte celular en ausencia de inmunización previa. Esta actividad citotóxica la realizan mediante diversas vías, encontrándose entre ellas la degranulación con liberación de gránulos citotóxicos con moléculas como las granzimas.(19)

En contra de lo que anteriormente se creía, existe una gran diversidad dentro de las células NK con subpoblaciones muy diferentes con funciones específicas.

En humanos, las células NK se identifican clásicamente por la ausencia de CD3 y la presencia de CD56. La mayoría de las células NK de sangre periférica expresan niveles bajos de CD56 y altos de CD16. Estas células se consideran maduras y se denominan células NK CD56^{dim}. Una pequeña proporción de células NK de sangre periférica expresan niveles elevados de CD56 sin expresar o con muy bajos niveles de CD16 y se considera una subpoblación más inmadura pero con funciones reguladoras denominadas células NK CD56^{bright}(88)

Las células NK expresan una amplia gama de receptores en superficie con funciones diversas. Algunos de los más conocidos son los KIR, NKG2A, KLRG-1 como receptores inhibidores y los NK2D, NKp46 o CD57 como activadores o efectores.

En cuanto al mecanismo de actuación de las células NK, se basa en el sistema del HLA. Todas las células del organismo expresan moléculas HLA de clase I como si fuera un marcador de "lo propio", sin embargo, aquellas dañadas o infectadas no lo hacen o lo hacen con unos niveles muy bajos de expresión. Las células NK están entrenadas para reconocer esta falta de lo propio eliminando todas aquellas células que no lo expresen (89,90).

Entre los múltiples mecanismos que utiliza el cáncer para escapar del sistema inmunológico, la pérdida de expresión del HLA es un mecanismo común para evitar la destrucción mediada por células T al hacerse de esta manera invisibles a ellas (91). A diferencia de las células T, el reconocimiento de las células tumorales por las células NK no requiere de la presentación de antígenos por el HLA (88)y además, como hemos visto,

las células NK son más activas contra las células tumorales con baja expresión de HLA (92).

Se ha observado que en tumores con baja expresión de HLA de clase I existen altos niveles de expresión de PD-L1 y sorprendentemente algunos de estos tipos de cáncer responden al bloqueo de PD-1/PD-L1. Estos hallazgos sugieren la existencia de una respuesta inmune independiente de las células T, inhibida por PD-1 y rescatada por el bloqueo de PD-1, que recientemente se identificó como dependiente de las células NK(93). Su presencia en tumores sólidos, como el cáncer de pulmón, es un factor de buen pronóstico y que condiciona una mayor SG (94-101).

JoyHsu et al observaron que las células T y células NK cooperaron durante el tratamiento con anti-PD-L1 en varios modelos de ratón, incluidos los modelos de CP. Por un lado, las células NK apoyan a los linfocitos T en la respuesta tumoral frente a tumores con alta expresión de HLA y autoantígenos, y por otro lado, se convirtieron en las principales células citotóxicas en aquellos tumores con baja expresión de HLA incluso en tumores sin expresión de PD-L1(93).

En los pacientes con cáncer, al igual que las células T, las células NK podrían expresar PD-1 regulando de esta manera su actividad antitumoral y contribuyendo a la inmunoterapia basada en PD-1. Sin embargo, sólo una pequeña fracción de las células NK expresan altos niveles de PD-1 y se corresponden con un subconjunto de células NK adaptativas completamente maduras que expresan CD57 y NKG2C(88). Además, se ha encontrado que su función antitumoral puede restaurarse únicamente de manera parcial mediante anticuerpos anti-PD-1/L1 dificultando de esta manera su completa activación(102). Otros datos sugieren que, en los pacientes con cáncer, las células NK están potencialmente moduladas por el bloqueo de PD-1(88,93,103).

Recientemente se acaba de publicar un estudio que pone en valor el papel de las células NK en la actividad inmune antitumoral en pacientes con mieloma múltiple. En animales modelo con mieloma múltiple se modificaron las células NK para que fueran capaces de reconocer los ligandos específicos del receptor de activación NKG2D. Este receptor está presente en la práctica totalidad de las células NK, linfocitos T CD8⁺ activados, células NKT y algunos subconjuntos de células T CD4⁺ y tiene la capacidad de reconocer y destruir las células infectadas y las células cancerosas. Esta actividad citotóxica la realiza al unirse a los ligandos de NKG2D (principalmente de las familias ULBP y MIC) los cuales son expresados por una gran proporción de células infectadas por virus o células tumorales. Este estudio mostró una fuerte actividad citotóxica anulando completamente el crecimiento del mieloma múltiple en modelos de ratón(104).

A pesar de que la infiltración de células NK es un biomarcador de buen pronóstico en diferentes cánceres, incluidos el CPM y el CPNM, su valor para predecir la eficacia de la inmunoterapia aún no está claro. Sin embargo, existen nuevos estudios que sugieren una correlación entre las células NK circulantes en sangre periférica y la eficacia antiPD-1/-L1(105)

1.7.1.5 Células NKT (células Natural killer T)

Estas células suponen un heterogéneo grupo de células T que comparten características de las células NK y los linfocitos T. Por un lado, a través del receptor TCR reconocen moléculas de origen lipídico presentadas por CD1d y por otro son capaces de reconocer ligandos de estrés a través de receptores de activación como NKG2D. Dentro de su gran heterogeneidad se distinguen dos tipos fundamentales:

- Células NKT tipo 1 o clásicas: son las mejor caracterizadas y presentan un único e invariante TCR.
- Células NKT tipo 2 o no clásicas: son más abundantes en el ser humano y parecen tener un repertorio oligoclonal de TCR.

Desde el punto de vista funcional, las células NKT producen citocinas y también presentan actividad citotóxica. Las células NKT tipo 1 que expresan el marcador CD4 producen citocinas del perfil Th1 (IL-2, IFN- γ y TNF- α) y del perfil Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), mientras que las células NKT CD4 negativas secretan sobre todo citocinas del perfil Th1. Las células que expresan el marcador CD8 (y también las células NKT CD4 negativas) presentan actividad citolítica (53,106).

Las células NKT tienen capacidad para producir citotoxicidad directa a través de moléculas que inducen la muerte celular, como perforina o FasL, y también actividad antitumoral indirecta a través de la activación posterior de muchas otras células inmunes como las células NK, linfocitos T CD8⁺, CD etc. Las células NKT completamente activadas también producen una gran cantidad de IFN- γ , que activa y recluta otras células con actividad antitumoral. Por todo ello, las células NKT son una de las células inductoras críticas que activan y reclutan varias células efectoras antitumorales en el TME y promueven una inmunidad antitumoral mejorada en pacientes con cáncer(107).

En los últimos estudios realizados, se ha observado que tanto las células NKT de tipo I como las de tipo II juegan un papel crítico en la inmunidad tumoral. Mientras que las células NKT de tipo I promueven con mayor frecuencia la inmunidad tumoral, las células NKT de tipo II la suprimen. Sin embargo, las células NKT de tipo I también pueden inducir Treg supresores y ambas poblaciones interactúan con otras células efectoras y reguladoras inmunes, formando una red compleja de regulación inmunitaria. A su vez, las células NKT de tipo I y II pueden regularse de forma cruzada entre sí, formando un eje inmunorregulador. Al regular las células NKT de tipo II, las células NKT de tipo I también determinan el equilibrio entre estas últimas y las Treg para determinar cuál dominará en el control de la inmunidad dentro de un tumor particular, regulando los reguladores. Esto tiene implicaciones clínicas porque cuando las células NKT de tipo I están ausentes, tal y como ocurre a menudo en los pacientes con cáncer, tanto las células Treg como las células NKT de tipo II pueden suprimirse en el mismo tumor(108).

Se ha observado en diferentes estudios, que un nivel bajo de células NKT se relaciona con un peor pronóstico y una mayor carga tumoral, aunque no existe por el momento, evidencia de cómo afecta esta concentración de células NKT, a la respuesta a los tratamientos con inmunoterapia. (107,109-113).

- 1.7.2 Grupos inmunes pronósticos

El creciente conocimiento existente acerca de la relación entre el sistema inmunológico y el crecimiento tumoral ha creado la necesidad de clasificar a los tumores no solo por su tamaño y su afectación metastásica, sino también por el fenotipo, función y ubicación de las células inmunes.

Recientemente se ha establecido un modelo predictor de respuesta inmune que distribuye a los tumores en cuatro grupos según la expresión de PD-L1 (positiva o negativa) y el estado de TIL (positiva o negativa) en el TME. Según esta clasificación, un tumor con ambos biomarcadores positivos va a lograr una respuesta adecuada a la inmunoterapia. Sin embargo, si el TME es PD-L1⁺ pero presenta una baja infiltración por TIL, es más probable que sea refractaria a la monoterapia con PD-1/PD-L1(114).

Este modelo se ha utilizado en diferentes estudios para dividir a los tumores en función de las interacciones entre la inmunidad del huésped y el tumor y se han propuesto cuatro fenotipos: caliente, excluido, inmunosuprimido y frío. Los tumores calientes muestran un alto grado de infiltración de células T y una alta expresión de puntos de control inmunitarios (PD-1, CTLA-4, TIM-3 y LAG-3). Por el contrario, los tumores fríos se caracterizan por una ausencia de células T dentro del tumor y, por tanto, baja respuesta a la inmunoterapia (baja carga de mutaciones tumorales, mala presentación de antígenos e insensibilidad intrínseca a la muerte mediada por células T). El fenotipo excluido refleja la capacidad del tumor para permanecer oculto al sistema inmunológico con una ausencia de infiltración de células T dentro del lecho tumoral y una acumulación en el tejido circundante del tumor, frecuentemente bloqueado por barreras físicas como la matriz extracelular o los fibroblastos. Finalmente, el fenotipo inmunosupresor muestra un bajo grado de infiltración tumoral debido a un ambiente inmunosupresor en el tumor con presencia de células inmunosupresoras y mediadores inhibidores solubles(115).

En pacientes con melanoma metastásico, la presencia de fenotipos inmunosuprimidos, excluidos y fríos se correlaciona con peores respuestas a los tratamientos antiCTLA-4 y antiPD-L1 en comparación con los tumores calientes(116,117). Recientemente, Lizotte et al identificaron estos fenotipos también en CPNM (118).

Se espera que un estudio más detallado sobre los factores que modulan la inmunidad tumoral en TME mejore estos modelos, creando huellas dactilares inmunes de TME individualizadas para guiar la elección de los tratamientos de una manera personalizada y mejorar, de esta manera, la eficacia de la inmunoterapia mediante el desarrollo de nuevos fármacos o combinaciones de los ya existentes.

En la tabla 1 se recogen todos los estudios previamente comentados que se han realizado para confirmar la utilidad de estos biomarcadores del TME en pacientes oncológicos tratados con inmunoterapia. En la tabla 2 se recogen los estudios realizados en sangre periférica.

Tumor	Tratamiento de inmunoterapia	Tipo de estudio	Resultados que se asocian con un mejor pronóstico	Ref
CPNM	anti PD-L1	Retrospectivo	Células T PD-1 ⁺ CD8 ⁺ en TME se asocia con respuesta al tratamiento y mayor SG	(56)
CPNM	anti PD-1	Prospectivo	<ul style="list-style-type: none"> La coexpresión de PD-1, LAG-3 y TIM-3 se asociaba con una activación prominente de células T con función efectora (GzmB⁺). LAG-3 elevado que se asociaba significativamente con una SLP más corta 	(60)
CPNM	durvalumab	Ensayo clínico	Células T PD-1 ^{alto} CD8 ⁺ pre-tratamiento en TME se asocia con mayor TR, SG y SLP	(62)
CPNM	atezolizumab	Ensayo clínico	Células T PD-1 ^{alto} CD8 ⁺ pre-tratamiento en TME se asocia con mayor TR y SG	(63)
CPNM	pembrolizumab ni volumab	Prospectivo	Células Treg PD-1 ^{alto} CD8 ⁺ y PD-1 ^{alto} CD4 ⁺ en TME se asocia con un mejor pronóstico	(71)
CPNM	anti PD-L1	Retrospectivo	CD8 ⁺ /CD4 ⁺ >2 en TME se asocia con una mayor respuesta	(79)
Melanoma	pembrolizumab	Ensayo clínico	Altos niveles de células T de memoria CD8 ⁺ /CD4 ⁺ /CD45RO en TME en pacientes respondedores	(80)
CPNM	Inmunoterapia	Prospectivo	<ul style="list-style-type: none"> Altos niveles de células Trm CD103⁺ CD8⁺ en TME en estadios precoces de CPNM se asocian con mejor SG. Correlación positiva entre una alta infiltración por TILs CD103⁺ en pacientes con CPNM y la SLP 	(87)

Tabla 1: Estudios sobre biomarcadores de respuesta a la inmunoterapia en TME

Tumor	Tratamiento de inmunoterapia	Tipo de estudio	Resultados que se asocian con un mejor pronóstico	Ref
CPNM	Inmunoterapia	Retrospectivo	Altos niveles de linfocitos T CD8 ⁺ en sangre periférica al inicio del tratamiento se correlacionan con respuestas más duraderas	(119)
CPNM	nivolumab	Prospectivo	<ul style="list-style-type: none"> • Mayores niveles de células T CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺PD1^{low}/se correlacionan con mayor SG • Niveles bajos de T CD8⁺ PD1⁺ basal se relacionan con mejor pronóstico • Niveles basales bajos de células NK se correlacionan con mayor SG 	(120)
CPNM	pembrolizumab nivolumab atezolizumab	Prospectivo	Una proliferación temprana de células T PD-1 ⁺ CD8 ⁺ en sangre periférica durante el tratamiento con inmunoterapia se asocia con una mayor respuesta	(121)
CPNM	nivolumab	Prospectivo	<ul style="list-style-type: none"> • Una proliferación temprana de células T PD-1⁺ CD8⁺ en sangre periférica durante el tratamiento con inmunoterapia se asocia con una mayor respuesta • Concentración de células NK CD56⁺ 2 veces mayor en sangre periférica en el grupo de respondedores • Mayor concentración de Treg en sangre periférica en el grupo de respondedores • Ratio células NK CD 56⁺ + células T PD-1⁺ CD8⁺ / MDSCs+ TregFOXP3⁺ en sangre periférica aumentado en respondedores 	(122)
CPNM	nivolumab o pembrolizumab	Cohorte	<ul style="list-style-type: none"> • Una proliferación temprana de células T PD-1⁺ CD8⁺ en sangre periférica durante el tratamiento con inmunoterapia se asocia con una mayor respuesta 	(123)
CPNM	atezolizumab	Prospectivo	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento en la concentración de linfocitos T CD8⁺ activados por neoantígeno durante el tratamiento, en pacientes que experimentaban respuesta al mismo. 	(124)
CPNM	inmunoterapia	Cohorte	La disminución de T CD4 ⁺ FOXP3 ⁻ PD-1 ^{high} dentro del tumor y en sangre periférica durante el inicio del tratamiento se asoció significativamente con una mejora de la SG	(125)
CPNM	anti-PD-L1	Cohorte	<ul style="list-style-type: none"> • Un alto porcentaje de células TCD4⁺ efectoras y de memoria (CD62^{low}) antes del inicio del tratamiento se relaciona con una mejor respuesta. • Un alto porcentaje de linfocitos Treg (CD25⁺ FOXP3⁺ CD4⁺) antes del inicio del tratamiento se relaciona con no respuesta al tratamiento. • La formula T CD62^{low}CD4⁺/células T CD25⁺FOXP3⁺ predice respuesta 	(126)
CPNM	Inmunoterapia	Prospectivo	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor concentración de células NK, linfocitos T CD4⁺ y ratio CD4⁺/CD8⁺ se relacionan con una mayor respuesta a la inmunoterapia. • Menor concentración de Treg se relacionan con una mayor respuesta a la inmunoterapia. • Mayor concentración de célulasNK y ratio CD4⁺/CD8⁺ se relaciona con un aumento de la SLP 	(127)
CPNM	nivolumab	Ensayo clínico	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de linfocitos T CD4⁺ PD-1⁺ y célulasNK a nivel basal se relaciona con mayor respuesta • Aumento de la expresión de NKG2D y CD56 en células T en respondedores 	(128)
CPNM	Inmunoterapia	Cohorte	Un alto número de células T CD4 de memoria central con baja	(129)

			coexpresión de PD-1 o LAG-3 al inicio del tratamiento se relaciona con mayor respuesta	
Melanoma	Anti-PD-1	Cohorte	La expansión de células T de memoria citotóxicas (CCR7 ⁻ CD27 ⁻ CD8 ⁺) se correlaciona con respuesta al tratamiento	(130)
CPNM	nivolumab	Retrospectivo	Mayor SLP en pacientes con ratio en sangre periférica de células T CM/efectoras elevado	(131)
CPNM	Inmunoterapia	Prospectivo	La actividad general o el número de células NK en el grupo que responde a la inmunoterapia es mayor que en los que no responden.	(132)
CPNM	Inmunoterapia	Prospectivo	El porcentaje de células NK basal era mayor en los respondedores	(105)
CPNM	Inmunoterapia	Prospectivo	Altos niveles de células NK basales se relacionan con una mejor respuesta y mayor SLP	(133)
CPNM	Inmunoterapia	Caso-control	Ratio basal CD8 ⁺ /CD4 ⁺ elevado en sangre periférica se asocia con un mejor pronóstico	(134)
CPNM	anti PD-L1	Retrospectivo	<ul style="list-style-type: none"> • NLR basal < 4 en sangre periférica se asocia con mejores tasas de respuesta, duración de respuesta, SLP y SG. • NLR < 4 en sangre periférica en la semana 8 de tratamiento se asocia con una respuesta objetiva al tratamiento 	(135)
Melanoma	ipilimumab	Prospectivo	Valores de ALC 1,35 veces más altos con respecto al valor inicial en las primeras 2 semanas de tratamiento se relacionan con mayor SG	(136)
Melanoma	anti PD-L1 anti CTLA-4	Retrospectivo	<ul style="list-style-type: none"> • Menor número de células T CD45RA⁺ tanto en linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺ en sangre periférica en respondedores a anti-CTLA4 • Mayores células T de memoria en sangre periférica en respondedores a anti CTLA-4 en comparación con los no respondedores. • Mayor número de células NK CD69⁺ en sangre periférica en respondedores a anti PD-L1 en comparación con no respondedores 	(137)

Tabla 2: Estudios sobre biomarcadores de respuesta a la inmunoterapia en sangre periférica

Tabla 1 y 2: CPNM: cancer de pulmón no microcítico, **CTLA-4:** Antígeno citotóxico-4 de linfocitos T, **PD-1:** muerte celular programada-1, **TME:** microambiente tumoral **Treg:** células T reguladoras, **FOXP3+:** Forkhead box P3, **NK:** Natural killers, **MDSCs:** células mieloides con actividad supresora **ALC:** linfocitos absolutos totales, **TILs:** linfocitos infiltrantes tumorales, **Trm:** células T residentes de memoria, **NLR:** ratio neutrófilos linfocitos. **SG:** Supervivencia global **SLP:** supervivencia libre de progresión, **CM:** memoria central

2. ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En la mayoría de los tumores, pero más concretamente en el CP, es difícil obtener mediante biopsia, tejido suficiente que permita estudiar toda la heterogeneidad del tumor, así como su fenotipo y las características de su TME. Las biopsias tumorales son procedimientos invasivos, difíciles de conseguir y en la mayoría de las ocasiones aportan poco material para estudiar las células inmunitarias. Por todo ello, existe una necesidad creciente en encontrar muestras biológicas menos invasivas y fáciles de conseguir, como por ejemplo la sanguínea, para el estudio de los biomarcadores de respuesta a la inmunoterapia.

Aunque es posible que las células inmunitarias presentes en la sangre no reflejen de una manera exacta los componentes del TME, su presencia en sangre periférica podría ser un reflejo indirecto de las poblaciones celulares del microambiente tumoral o de la respuesta continua movilizada por el huésped debido a la presencia del tumor, en muchas ocasiones diseminado a diferentes órganos. De hecho, algunos estudios han encontrado una buena correlación de diferentes biomarcadores celulares, como células T, CD o células NK, entre muestras de sangre y tejido tumoral. (138,139)

Por todo ello se han realizado varios estudios en pacientes con cáncer en tratamiento con inmunoterapia para intentar encontrar si existe algún elemento en la sangre que puede servir como biomarcador de respuesta al tratamiento.(140)

Desafortunadamente, el número de estudios relacionado con biomarcadores de respuesta a la inmunoterapia es todavía limitado, y no se han obtenido resultados concluyentes avalados con estudios de varios grupos independientes. Además, algunos datos previos sugieren, que probablemente debamos intentar buscar biomarcadores específicos para los diferentes agentes inmunoterápicos utilizados. Es decir, posiblemente no todos los biomarcadores serán útiles para todos los tipos de tumores ni para todos los tipos de tratamientos de inmunoterapia, por lo que se requerirá un enfoque más personalizado y preciso. Por ejemplo, Pryyanka y colaboradores(137) encontraron que anti-CTLA-4 y anti-PD-L1 tienen biomarcadores predictivos distintos en los linfocitos circulantes. Por un lado, los pacientes con menor número de linfocitos T CD45RA⁺ tanto en linfocitos T CD4⁺ (p: 0,038) como en linfocitos T CD8⁺ (p: 0,019) presentaron peor respuesta a anti-CTLA-4. Además, las células T de memoria fueron más altas en los que respondieron en comparación con los que no respondieron. Por el contrario, estas correlaciones no se encontraron en pacientes tratados con antiPD-L1. En este caso, los pacientes que respondieron tenían un número significativamente mayor de células NK CD69⁺ CD56^{dim} que los que no respondieron, sin observar diferencias en los pacientes anti-CTLA-4.

Por tanto, se requieren de nuevos trabajos para confirmar y expandir el potencial de los subconjuntos de las células inmunes circulantes como biomarcadores predictivos de la respuesta a la inmunoterapia.

Por todos estos motivos, se ha planteado este estudio con el objetivo de analizar de forma prospectiva una cohorte de pacientes con cáncer de pulmón que reciben tratamiento con inmunoterapia e intentar determinar biomarcadores celulares en sangre periférica predictivos de respuesta.

Hipótesis

Basándonos en los antecedentes presentados, planteamos la hipótesis de que la presencia de diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺, T CD4⁺ y/o de células NK expresando diferentes marcadores de activación y/o agotamiento en sangre periférica podrían predecir la eficacia de las terapias con inhibidores del control inmune en CPNM

Objetivos:

- Objetivo primario:
 - Analizar de forma prospectiva en una cohorte de pacientes con CPNM si la presencia de diferentes subpoblaciones de linfocitos T y células NK predice una mayor supervivencia global en pacientes en tratamiento con inmunoterapia.
- En concreto analizaremos si las siguientes subpoblaciones se relacionan con la supervivencia global, lo que representa los objetivos secundarios de este trabajo
 - subpoblaciones de células NK activadas y/o agotadas.
 - subpoblaciones células NKT.
 - subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺ activados y/o agotados.
 - linfocitos Treg, incluyendo la proporción TCD8⁺/Treg.
 - linfocitos T de memoria.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Población y tipo de estudio

Se define un tamaño muestral con 50 pacientes más un 10% (5 pacientes) por las posibles pérdidas con un total de 55 pacientes que será incluidos de forma prospectiva. El cálculo muestral considerado obedece a criterios exploratorios de búsqueda de señales iniciales de evidencia científica ante la escasez de información disponible, así como a ajustes de presupuesto.

La procedencia de los pacientes será la consulta de cáncer de pulmón del servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza (sector 3).

El sector sanitario Zaragoza 3, de la Comunidad Autónoma de Aragón, incluye los centros de atención sanitaria de: Alagón, Bombarda, Borja, Cariñena, Casetas, Delicias Norte, Delicias Sur, Ejea de los Caballeros, Épila, Gallur, Herrera de los Navarros, La Almunia de Doña Godina, María de Huerva, Miralbueno, Oliver, Sádaba, Sos del Rey Católico, Tarazona, Tauste, Universitas, Utebo y Valdefierro.

La selección de los pacientes incluidos se realizó tras solicitar la aprobación del Comité de Ética de Investigación de la Comunidad autónoma de Aragón (CEICA; CP-C.I. PI19/052) y se realizó de manera prospectiva seleccionando a todos los pacientes que iniciaban un tratamiento con inmunoterapia desde abril 2019 a octubre de 2020.

Se realizó un estudio de tipo observacional, descriptivo, prospectivo, sobre una cohorte de 55 pacientes controlados por el Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza.

Este trabajo forma parte de un proyecto mayor en el que se han estudiado otros biomarcadores de respuesta a la inmunoterapia como sería la microbiota, el TMB y la toma de antibióticos o corticoides.

3.2 Criterios de inclusión

- CPNM no reseado (localmente avanzado y metastásico: estadios III y IV)
- Diagnóstico de tumor de novo o tras resistencia o recidiva a un tratamiento diferente a una inmunoterapia.
- Candidatos a tratamiento con inmunoterapia.
- No tratados previamente con ninguna inmunoterapia.
- Firma de consentimiento informado para participar en este proyecto.

3.3 Criterios de exclusión

- Contraindicación para el tratamiento con inmunoterapia.

3.4 Variables

- Edad: Fecha nacimiento
- Sexo: varón o mujer
- Raza: caucásica, asiática, negra u otros
- Tabaco: No fumador y fumador/exfumador.
- Escala de estado funcional diseñada por el Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG): 0 ó 1
- Histología: No células pequeñas escamoso o No células pequeñas no escamoso.
- Fecha de diagnóstico del cáncer de pulmón
- Estadio tumoral: III o IV
- Indicación de tratamiento: localmente avanzado, paliativo primera línea o paliativo líneas sucesivas.
- Tipos de inmunoterapia
 - Anti-PD-1:
 - Nivolumab.
 - Pembrolizumab.
 - Anti-PD-L1:
 - Atezolizumab.
 - Durvalumab.
 - Avelumab.

- Anti-CTLA-4:
 - Ipilimumab.
- Combinaciones:
 - Nivolumab + Ipilimumab
 - Durvalumab + Tremelimumab
- Fecha de inicio del tratamiento con inmunoterapia
- Fecha de fin del tratamiento con inmunoterapia
- Fecha de respuesta a la inmunoterapia
- Fecha de progresión a la inmunoterapia
- Fecha de fallecimiento
- Mejor respuesta a la inmunoterapia: Respuesta completa (RC), respuesta parcial (RP), enfermedad estable (EE), progresión (PR) o no evaluable.

3.5 Tipo de muestras:

Se extrajo una muestra de sangre periférica al inicio del tratamiento. Las muestras se recogieron en régimen de Biobanco y se incorporaron en el Biobanco del Sistema de Salud de Aragón.

3.5.1 Procesamiento de las muestras

Se recogió la sangre periférica en tubos de heparina sódica y posteriormente fue centrifugada durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente a 2600 revoluciones por minuto (rpm). De esta manera, se consigue separar la fracción celular del plasma, que se extrajo con pellet celular y se almacenó a -80°C para su uso posterior.

El pellet celular se diluyó en un medio celular para cultivo de células humanas (RPMI medio 1640) mediante una proporción 1:1 y se añadió cuidadosamente al medio Histopaque. – 1077(Sigma). Tras centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos, se aislaron las células linfocitarias y otras células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Seleccionándose esta capa de células, se procedió a su lavado con RPMI1640 y se dividieron en alícuotas para su posterior tinción y análisis mediante citometría de flujo.

3.5.2 Tinción, paneles de anticuerpos y citometría de flujo

Para realizar la tinción de la superficie celular, PMBCs fueron suspendidas en 50 μ L de solución salina tamponada con fosfato (PBS) con 5% de suero fetal bovino (FCS). Se tiñeron con los diferentes paneles de anticuerpos durante 20 minutos a 4°C en oscuridad y se lavaron en un segundo tiempo con PBS + 5% FCS. Finalmente se mezcló durante 30 minutos a 4°C en oscuridad usando paraformaldehído al 2%.

Aquellas células que requerían tinción intracelular fueron permeabilizadas durante 30 minutos a 4°C en oscuridad usando un kit tampón de factor de transcripción FoxP3 (Miltenyi). Posteriormente, se lavaron las células en dos ocasiones con tampón de permeabilización y fueron suspendidas en 50 μ L de dicho tampón con tinción y fijación posterior con anticuerpos intracelulares durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Todas las muestras fueron procesadas con Gallios (Beckman Coulter) Flow Cytometer.

La lista de anticuerpos utilizados para el fenotipado de células inmunes se detalla en la tabla 3.

Anticuerpo	Fluoroforo	Casa	Referencia
CD16	FITC	Miltenyi	130-113-392
GzmB	PE	Miltenyi	130-116-486
CD56	PerCP Vio700	Miltenyi	130-114-551
NKG2A	PE-Vio770	Miltenyi	130-113-567
NKp46	APC	Miltenyi	130-092-609
CD57	APC-Vio 770	Miltenyi	130-11-813
NKG2D	BV421	BD	743558
CD3	VioGreen	Miltenyi	130-113-134
TIM3	PE-Vio770	Biolegend	345014
LAG3	APC	Miltenyi	130-105-453
PD-1	Alexa Fluor700	Biolegend	329952
CD8	FITC	Miltenyi	170-078-007
FoxP3	FITC	Biolegend	320106
CD25	APC	Miltenyi	130-113-280
CD4	VioBlue	Miltenyi	130-113-258
CD27	PE	Miltenyi	130-113-630
CD45RO	PE-Vio770	Miltenyi	130-113-551
CCR7	APC	Miltenyi	130-108-286

Tabla 3: Anticuerpos utilizados para el fenotipado de las células inmunes

3.6 Tipos de determinaciones:

- Poblaciones de linfocitos T CD8⁺ (PD-1, TIM3, LAG3, GzmB⁺) en muestra de sangre periférica mediante citometría de flujo.
- Cociente de linfocitos T CD8⁺ PD-1⁺GzmB⁺/ linfocitos Treg CD4⁺GzmB⁺ en muestra de sangre periférica mediante citometría de flujo.
- Poblaciones de células NK (CD56, CD3, CD16, KIR, KLRG1, CD94/ CD56, CD3, PD1, LAG3, TIM3, CD57, CD69 / CD56, CD3, CD16, NKp44, NKp46, NKG2D, NKG2A, GzmB⁺, CD57) en muestra de sangre periférica mediante citometría de flujo.
- Linfocitos T de memoria (CD8, CD4, CD45RO, CCR7, CD27, CD57) en muestra de sangre periférica mediante citometría de flujo.
- PD-L1 en muestra de biopsia pulmonar. El diagnóstico histopatológico y el análisis de la expresión de PD-L1 fueron realizados por un patólogo experto en patología pulmonar. Se consideró que las muestras eran adecuadas para tinción de PD-L1 si presentaban más de 100 células neoplásicas evaluables. Las muestras que estaban fijadas en formaldehído al 4%, tamponadas e incluidas en parafina, se cortaron en fracciones de tejido de 4 μ m de espesor y fueron teñidas con hematoxilina-eosina e incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 (E1L3N[®]) XP[®] RabbitmAb en sistema automatizado Benchmark ULTRA de Ventana. La evaluación de la expresión de PD-L1 se realizó en base a un recuento manual del porcentaje de células neoplásicas con tinción de membrana, fuese parcial o completa, independiente de su intensidad. Se considera PD-L1 negativo si se expresa en un porcentaje menor al 1%. Dentro de los PD-L1 positivos se ha dividido en una expresión mayor del 50% o entre el 1 y el 50%.
- LDH en muestra de sangre periférica. Se ha tomado el valor 214 U/L como límite superior de la normalidad.

3.7 Análisis estadístico

Las variables continuas se han expresado como mediana y la desviación típica como medida de dispersión. Las variables cualitativas se han expresado como porcentaje. Se han utilizado el test de la U de Mann Whitney o el test de T de Student en función de si la distribución de la variable era normal o no para realizar el contraste de hipótesis.

Para realizar el estudio de correlación se ha utilizado la ρ de Spearman para muestras de distribución no normal.

El análisis de supervivencia se ha llevado a cabo mediante curvas de Kaplan-Meier, utilizando el test de Log-rank para determinar la significación estadística en los análisis comparativos.

El impacto de las diferentes covariables en la supervivencia se ha evaluado mediante un modelo de regresión de Cox.

3.8 Consideraciones éticas

Los pacientes que aceptaron participar en el estudio únicamente fueron sometidos a una extracción sanguínea adicional, fuera de la práctica clínica habitual.

Todos los procedimientos de este estudio cumplían las recomendaciones para estudios de investigación hecha en seres humanos y siguiendo las Normas de Buena Práctica Clínica y la Declaración de Helsinki, revisada en Tokio, Venecia, Hong-Kong, Sudáfrica, Edimburgo y Fortaleza (Brasil) 2.013.

Los pacientes incluidos firmaron un consentimiento informado y la información obtenida fue tratada de forma anónima, mediante la utilización de un código de control y dos bases independientes con datos disociados. El acceso a ambas bases era exclusivo por el personal investigador, así como por un representante de la Autoridad Sanitaria y/o del Comité de ética correspondiente, si así lo requirieran.

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con la base en la que aparece exclusivamente un código de control creado para el estudio, sin datos demográficos ni personales que permitan la identificación de cada paciente. El tratamiento de los datos se hizo de forma anónima, con las medidas de seguridad establecidas en cumplimiento del Reglamento General de Protección de Datos (RGPD 2016/679), y se comunicó a los pacientes que pueden ejercer el derecho de acceso, rectificación y cancelación de sus datos.

El CEICA evaluó y emitió un dictamen favorable a la realización del proyecto en su reunión del día 27/02/2019, Acta Nº 04/2019 (C.I. PI19/052). El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente. Tanto la donación como la cesión de muestras se realiza conforme al RD1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los

requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica.

3.9 Conflicto de interés

Este estudio se ha llevado a cabo gracias a un contrato de I+D financiado por BMS y Roche.

Lo financiadores del estudio no han contribuido de ninguna manera en el diseño del estudio ni en ninguna de las partes de su desarrollo.

4. RESULTADOS

4.1 Análisis descriptivo

4.1.1 Características de los pacientes y de la enfermedad tumoral.

Dentro de los 55 pacientes incluidos en el estudio un 70.9% eran varones y 98.2% de raza caucásica con una mediana de edad de 65 años (DT 8.79) (Figura 3).

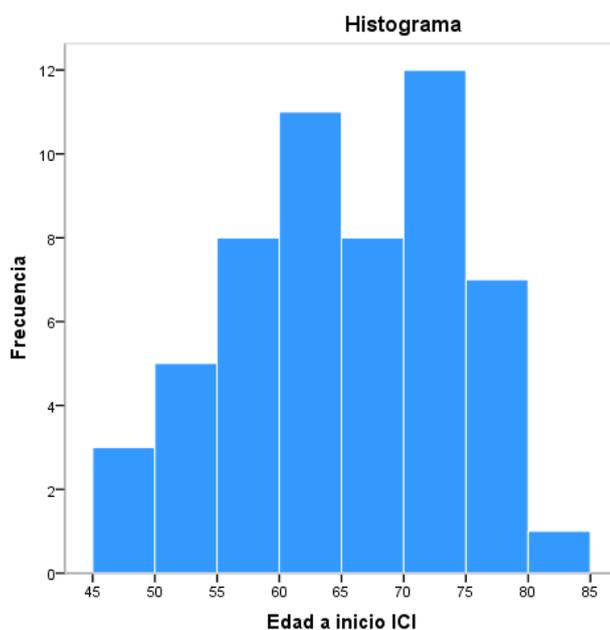


Figura 3: Distribución de la edad de los pacientes al inicio del tratamiento

Un 96.4% de los pacientes eran fumadores o lo habían sido con anterioridad siendo únicamente un 3.6% no fumadores. En cuanto al ECOG un 65.5% tenían un ECOG 0 y un 34.5% un ECOG 1, no existiendo ningún paciente con un ECOG 2 o superior.

Teniendo en cuenta las características tumorales, todos los pacientes incluidos en el estudio presentaban un cáncer de pulmón de células no pequeñas siendo un 40% de estirpe escamosa y un 60% de tipo no escamoso. Un 70.9% eran estadios IV y un 29.1% estadios III. En cuanto a la indicación de tratamiento, la mayoría de los pacientes se encontraban en un escenario paliativo (figura 4). Atendiendo al tipo de inmunoterapia recibida, el más utilizado fue pembrolizumab, seguido de atezolizumab, durvalumab y nivolumab (figura 5).

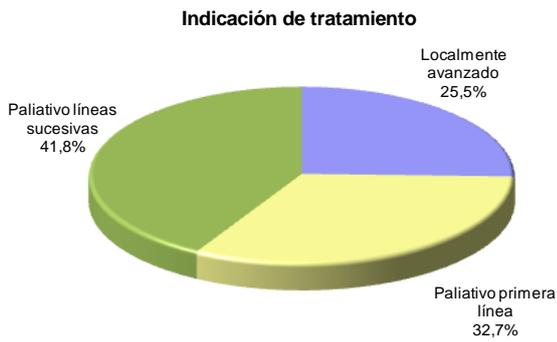


Figura 4: Distribución de indicación de tratamiento con ICI

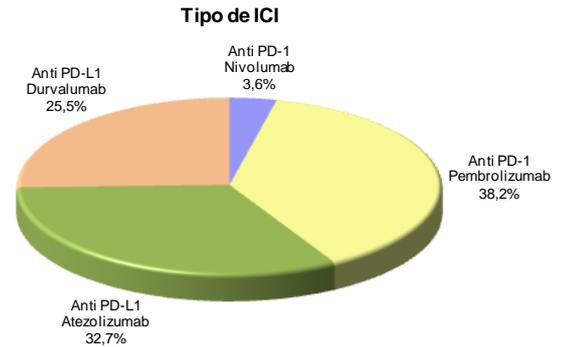


Figura 5: Distribución del tipo de ICI utilizada

F

Atendiendo a la respuesta producida por el tratamiento, un 63.6% de los pacientes obtuvieron respuesta con una mediana de tiempo de 2 meses (DT 2.59) y una duración de la respuesta de 7.5 meses (DT 6.61) (figura 6).

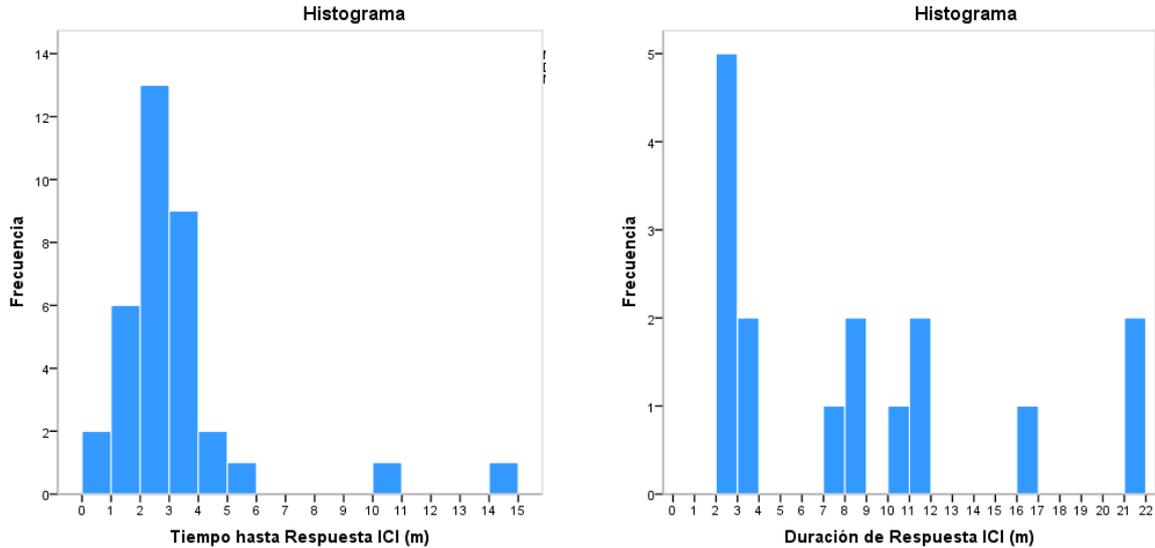


Figura 6: Distribución del tiempo hasta la respuesta y de la duración de la respuesta

La mejor respuesta experimentada tras el tratamiento se distribuía de la siguiente manera: 18.% de respuestas completas, 23.6% de respuestas parciales, 21.8% de enfermedad estable, 27.3% de progresiones y un 9.1% de no evaluables al tratarse de

pacientes que fallecieron antes de poder realizarse la primera revaloración por imagen (figura 7).



Figura 7: Distribución de la mejor respuesta a ICI en los pacientes

A lo largo del seguimiento, un 56.4% de los pacientes experimentaron una progresión de la enfermedad con una mediana de tiempo hasta la progresión de 4 meses (DT 6.67) (figura 8)

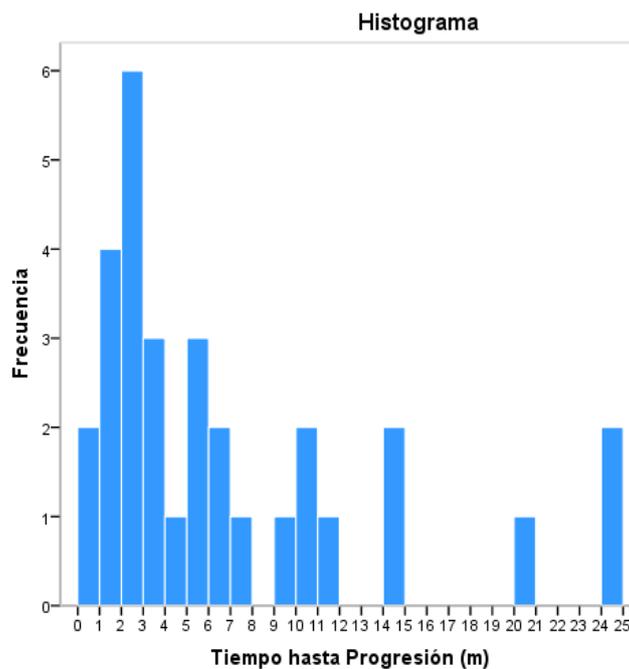


Figura 8: Distribución del tiempo hasta la progresión

Finalmente, un 58.2% de los pacientes fallecieron con una mediana de tiempo de 6 meses (DT 7.66) (figura 9).

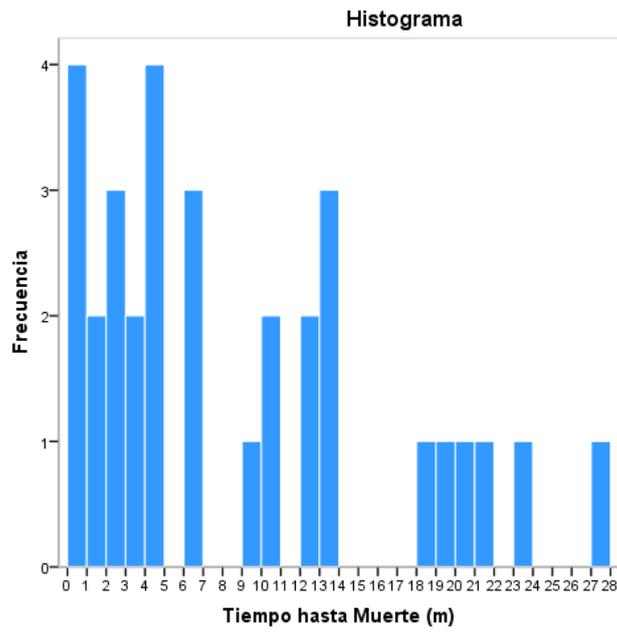


Figura 9: Distribución del tiempo hasta muerte

4.1.2 Determinaciones en poblaciones de linfocitos

Las poblaciones de linfocitos analizadas, así como la mediana y la medida de dispersión (expresada en %), se detallan en la tabla 4. Con el fin de diferenciar los linfocitos T activados de los agotados o exhaustos se analizó la expresión de los diferentes puntos de control tanto en células que expresaban la GzmB⁺(células activadas) como en aquellas que no la expresaban (células agotadas). De este modo diferenciamos las células activadas (gzmB⁺ TIM3⁺/PD1⁺/LAG3⁺) de aquellas agotadas (gzmB⁻ TIM3⁺/PD1⁺/LAG3⁺).

Población linfocitaria	Mediana (%)	Desviación típica (%)
Linfocitos T CD8 ⁺	28.5	25.8
Linfocitos T CD8 ⁺ PD1 ⁺	9.5	18
Linfocitos T CD8 ⁺ TIM3 ⁺	4.1	7.2
Linfocitos T CD8 ⁺ LAG3 ⁺	9.5	18.4
Linfocitos T CD8 ⁺ GzmB ⁺	31.7	25.5
Linfocitos T CD8 ⁺ GzmB ⁺ PD1 ⁺	1.3	10.7
Linfocitos T CD8 ⁺ GzmB ⁺ TIM3 ⁺	1.1	4.6
Linfocitos T CD8 ⁺ GzmB ⁺ LAG3 ⁺	2.1	8.8
Linfocitos T CD8 ⁺ GzmB ⁻	68.3	25.4
Linfocitos T CD8 ⁺ GzmB ⁻ TIM3 ⁺	2.2	5.3
Linfocitos T CD8 ⁺ GzmB ⁻ LAG3 ⁺	6.5	9.6
Linfocitos T CD8 ⁺ GzmB ⁻ PD1 ⁺	4.7	6.7
Linfocitos TCD8 ⁺ memoria	3.5	9.5
Linfocitos TCD4 ⁺	29.6	24.4
Linfocitos TCD4 ⁺ memoria	4.9	8.9
Linfocitos T CD4 ⁺ reguladores	6.5	8.8
Linfocitos T CD4 ⁺ reguladores GzmB ⁻	82.6	24.4
Linfocitos T CD4 ⁺ reguladores GzmB ⁺	17.4	24.4
Coficiente TCD8 ⁺ / TCD4 ⁺ reguladores	1	2.3

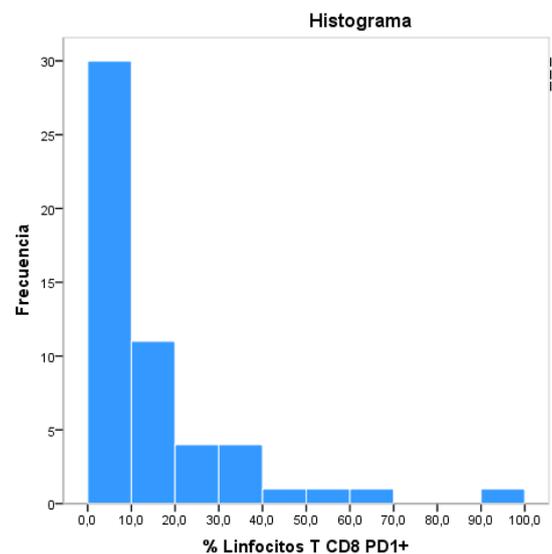
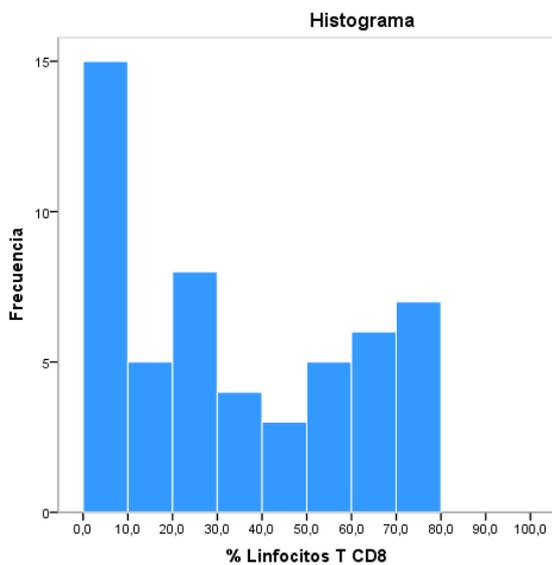
Tabla 4: Determinación de la frecuencia (%) de las poblaciones linfocitarias analizadas. Se indica la mediana y la desviación típica como medida de dispersión

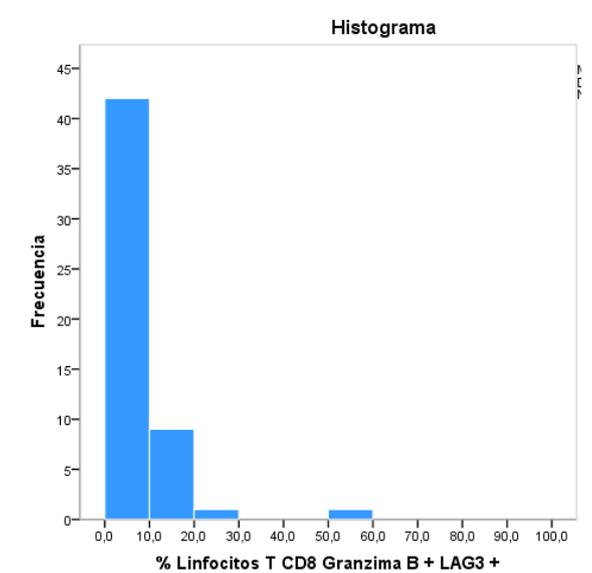
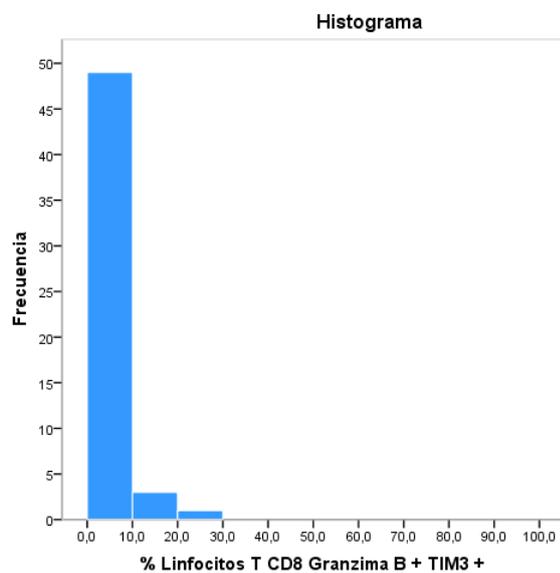
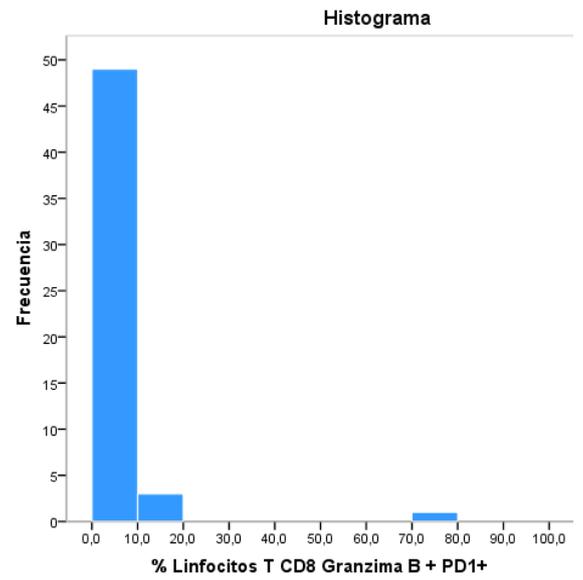
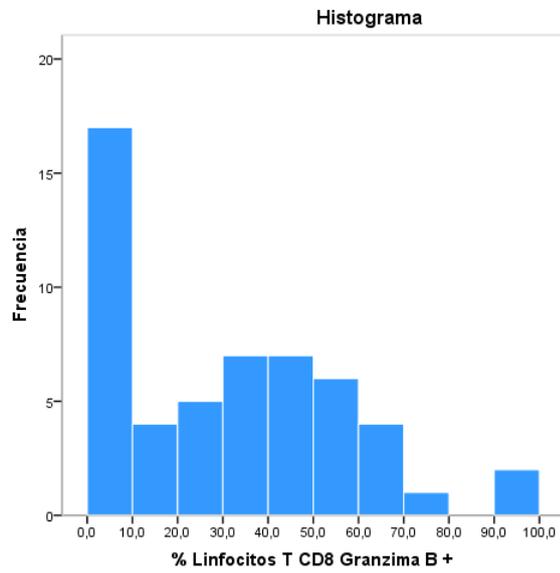
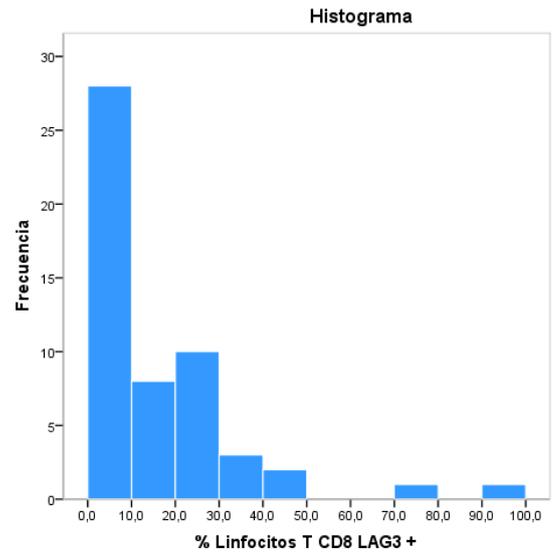
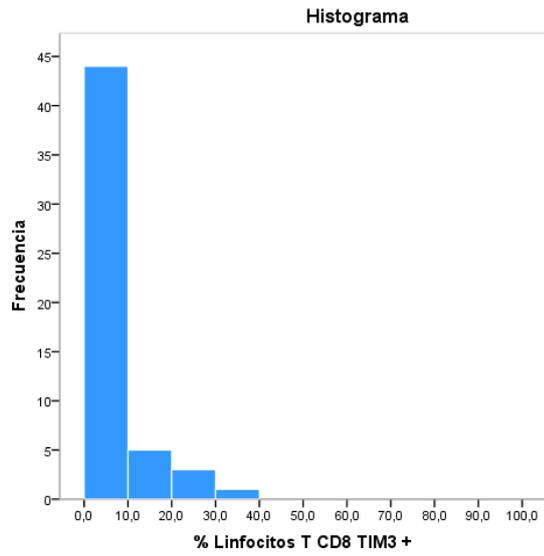
Tal y como podemos observar en la tabla 4, la distribución entre linfocitos TCD8⁺ y TCD4⁺ eran de un 28.5% y un 29.6% respectivamente. Analizando los linfocitos TCD8⁺, más de un 30% expresaban GzmB⁺, lo que indicaba un nivel de activación elevado. Sin embargo, cuando estas células activadas se analizaron en función de la expresión de los puntos de control inhibitorio, dicho porcentaje se redujo hasta menos del 2% tanto para TIM3⁺ como PD1⁺ o LAG3⁺. Con respecto a las células TCD8⁺ inactivas o exhaustas podemos observar que correspondían el 68.3% de los linfocitos TCD8⁺, existiendo en esta población una mayor expresión de los puntos de control inhibitorio como LAG3⁺ (6.5%) o PD1⁺ (4.7%).

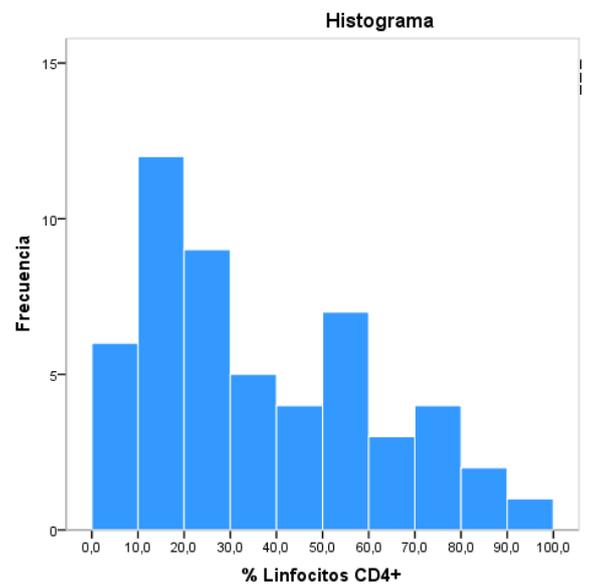
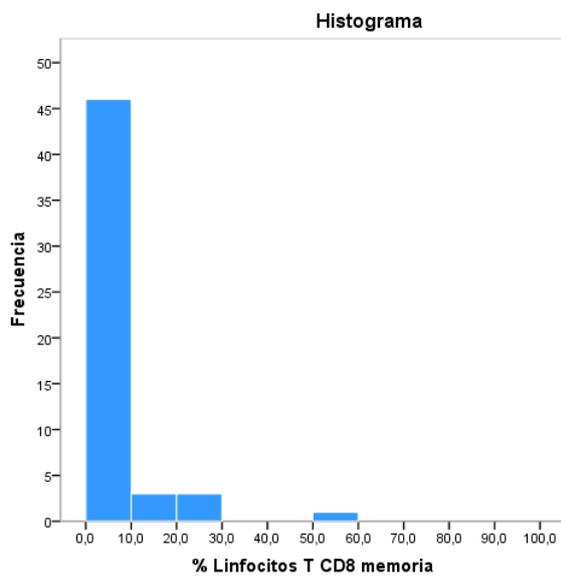
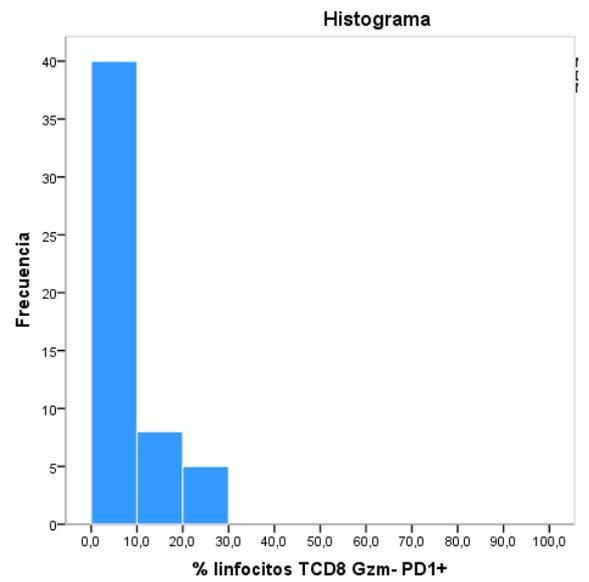
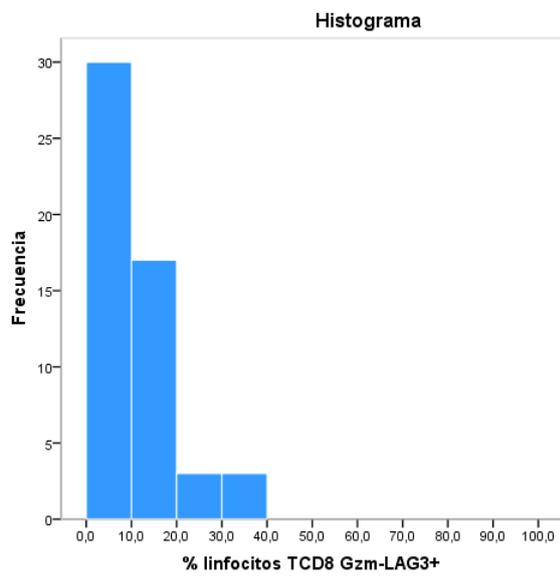
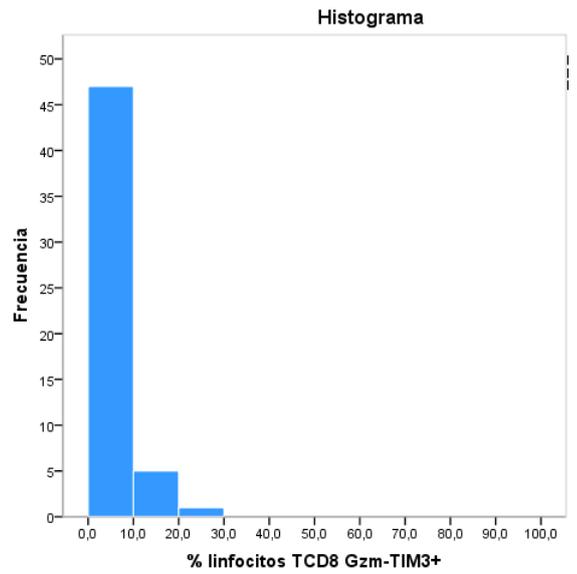
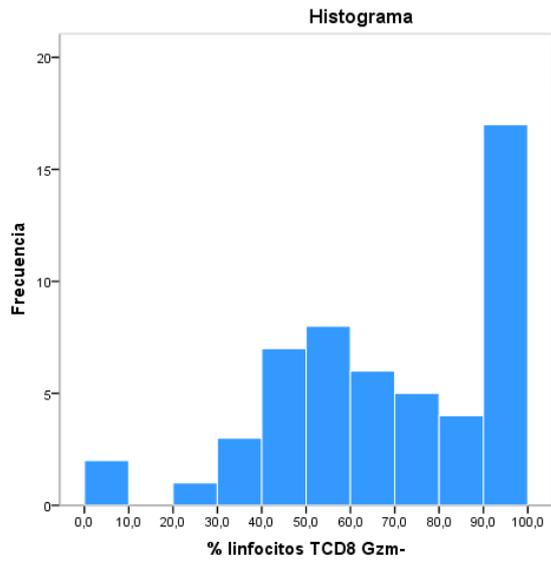
Los linfocitos T memoria correspondían un bajo porcentaje siendo un 3.5% TCD8⁺ y un 4.9% TCD4⁺.

En cuanto a los linfocitos TCD4⁺ reguladores puede observarse como en su gran mayoría (82.6%) se correspondían con linfocitos inactivos o exhaustos (GzmB⁻).

A continuación, pueden observarse los histogramas de distribución de cada una de las poblaciones detalladas previamente (figura 10).







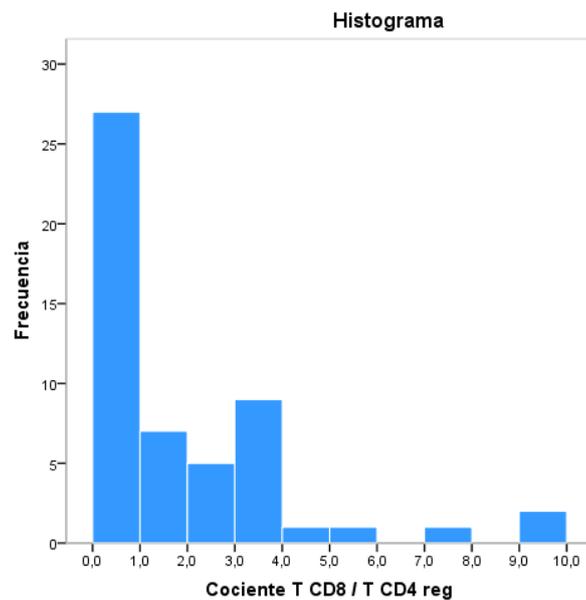
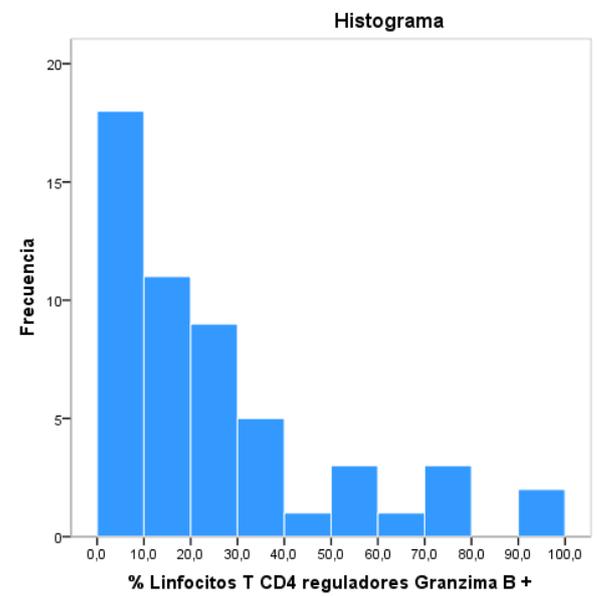
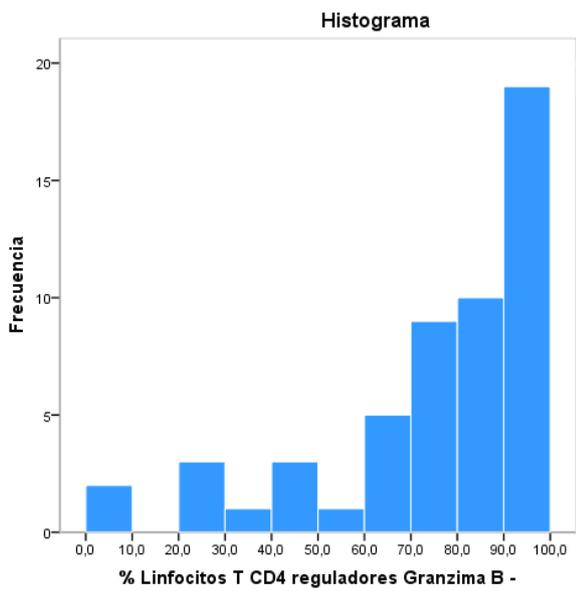
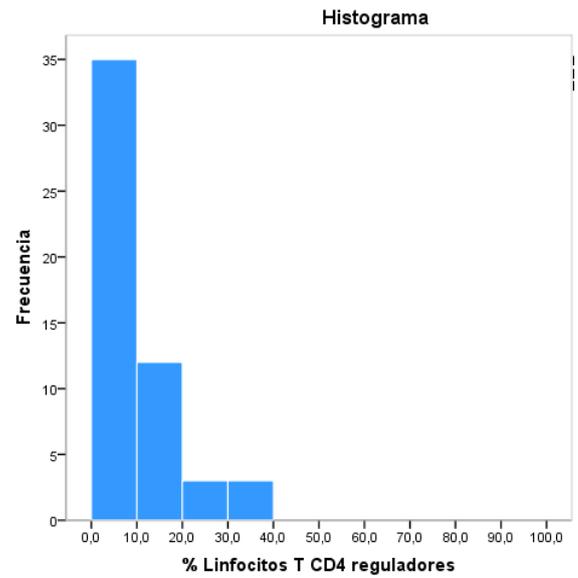
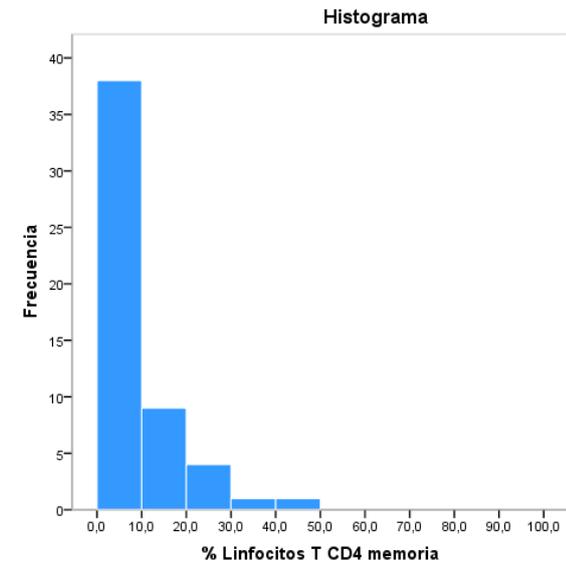


Figura 10: Histogramas de distribución de los linfocitos T

4.1.3 Determinaciones en poblaciones de células NK

Dentro de las células NK, se ha diferenciado entre la población de células NK con capacidades citotóxicas, llamadas CD56^{dim} (CD16⁺) y las células NK con una actividad citotóxica más baja, pero que muestran capacidades reguladoras, llamadas CD56^{bright} (CD16⁻). Además, se han analizado marcadores de activación (GzmB), de células altamente diferenciadas (CD57⁺), así como expresión de receptores de activación (NKp46⁺, NKG2D⁺) y de inhibición (NKG2A⁺, PD-1⁺, TIM3⁺, LAG3⁺).

También se ha estudiado la población de células NKT (CD56⁺CD3⁺), que pese a ser un tipo de células T, su análisis se ha incluido en este apartado al presentar también características de células NK, más relacionadas con el sistema inmune innato.

Las distintas poblaciones de células NK analizadas, así como la mediana y la medida de dispersión (expresada en %), se detallan la tabla 5.

Población de células NK	Mediana (%)	Desviación típica (%)
NK	15.7	11.4
NK CD3 +	7.5	9.2
NK CD56+ CD3- CD16+	93.3	17.5
NK CD56+ CD3- CD16+ TIM3 +	38.9	24.3
NK CD56+ CD3- CD16+ LAG3 +	16.6	25
NK CD56+ CD3- CD16+ PD1 +	5.9	15.3
NK CD56+ CD3- CD16+ GzmB +	94.8	18.6
NK CD56+ CD3- CD16+ GzmB+ TIM3+	32.3	20.7
NK CD56+ CD3- CD16+ GzmB+ LAG3+	21.3	19.1
NK CD56+ CD3- CD16+ GzmB + PD1+	5.3	17.8
NK CD56+ CD3- CD16+ GzmB -	4.1	17.4
NK CD56+ CD3- CD16+ GzmB - TIM3+	1	8.1
NK CD56+ CD3- CD16+ GzmB - LAG3+	0.1	8.6
NK CD56+ CD3- CD16+ GzmB - PD1+	0.2	5.4
NK CD56+ CD3- CD16+ CD57+	59.8	17.9
NK CD56+ CD3- CD16+ NKp46 +	74.2	23.4
NK CD56+ CD3- CD16+ NKG2D +	69	33
NK CD56+ CD3- CD16+ NKG2A +	45.9	21.9
NK CD56+ CD3- CD16-	6.8	17.5
NK CD56+ CD3- CD16- GzmB +	38.2	39.7
NK CD56+ CD3- CD16- PD1 +	9.5	15.3
NK CD56+ CD3- CD16- LAG3 +	5.0	13.8
NK CD56+ CD3- CD16- TIM3 +	40.7	22.5

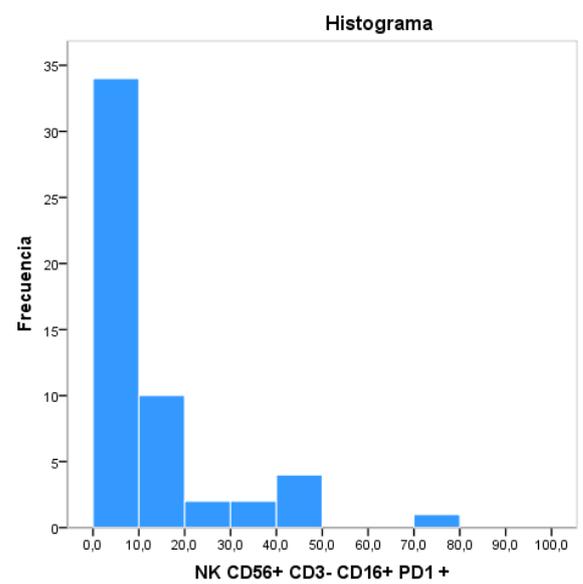
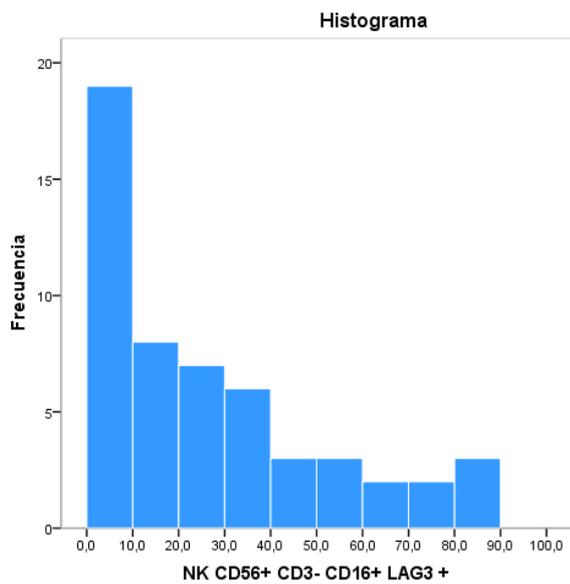
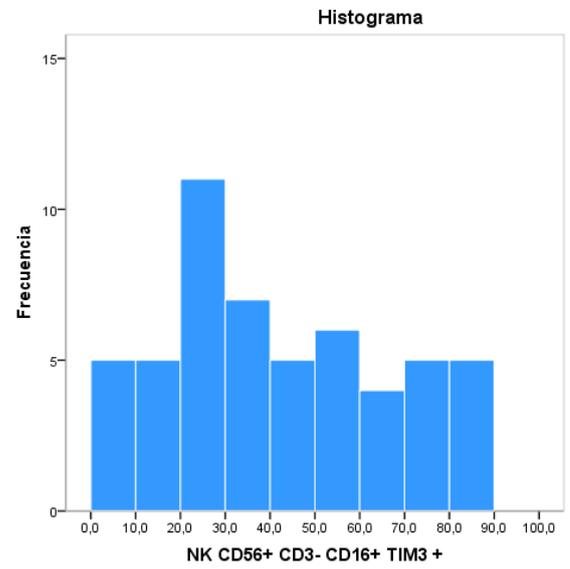
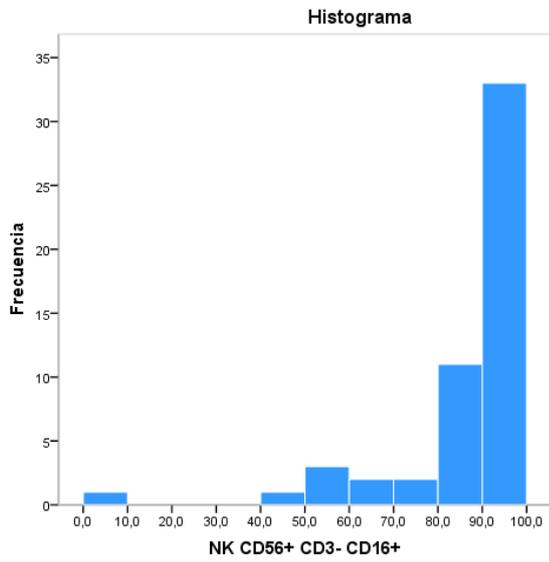
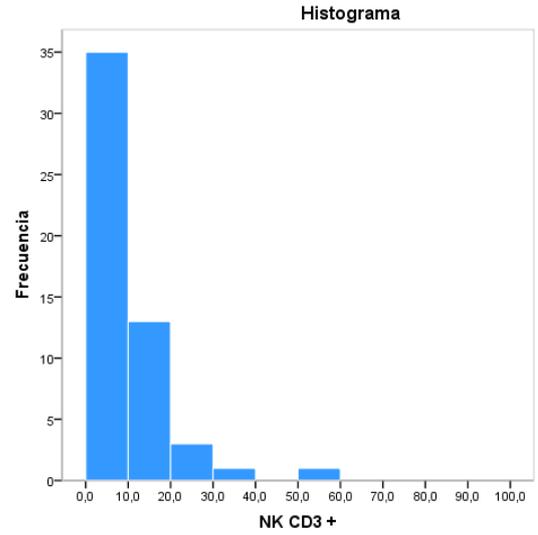
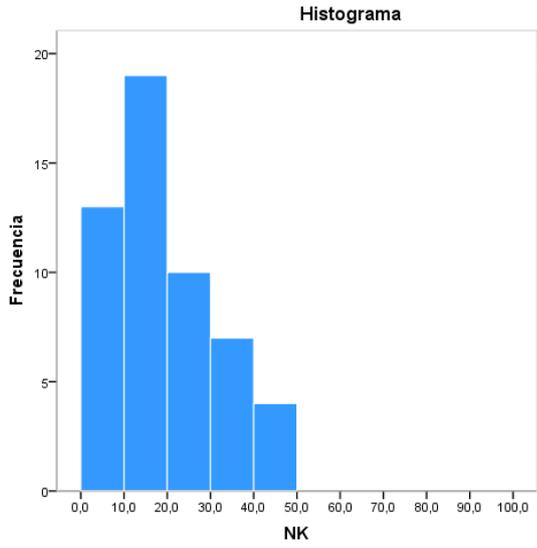
Tabla 5: Determinación de la frecuencia (%) de las poblaciones de células NK analizadas. Se indica con la mediana y la desviación típica como medida de dispersión

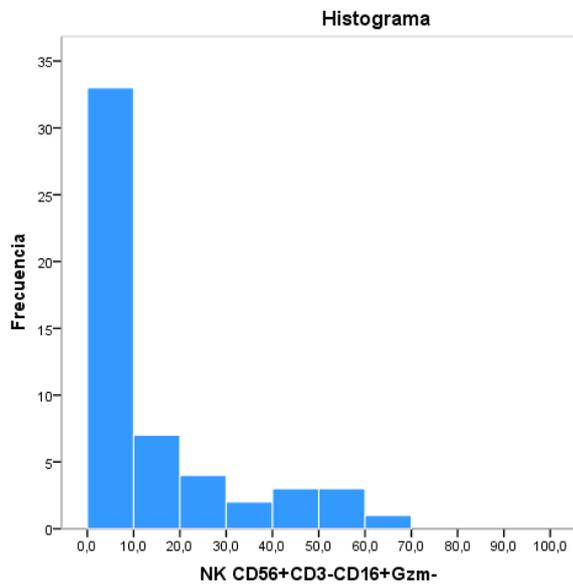
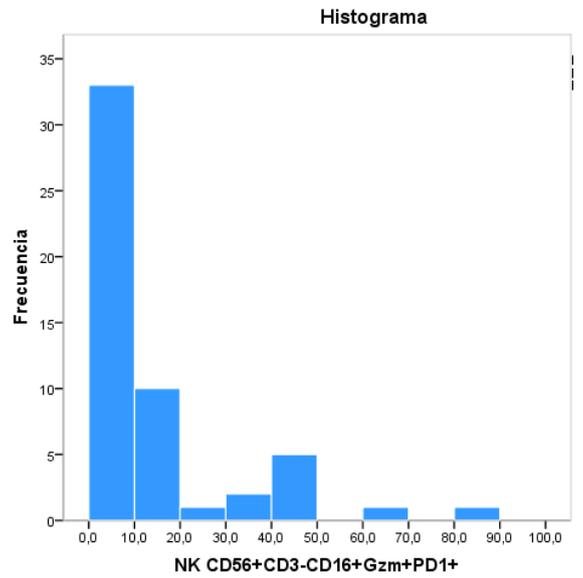
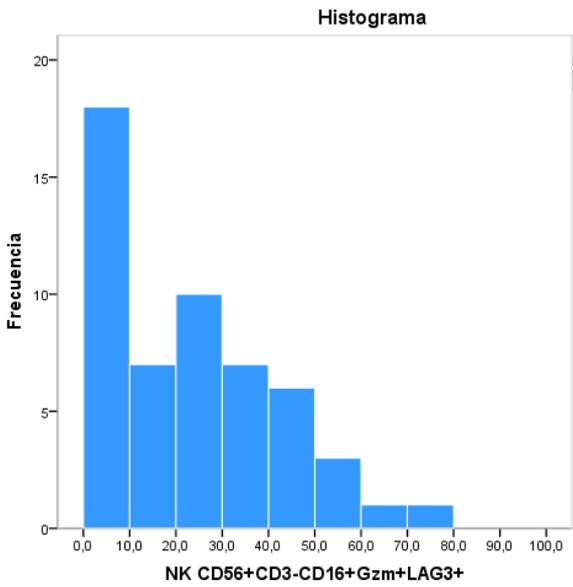
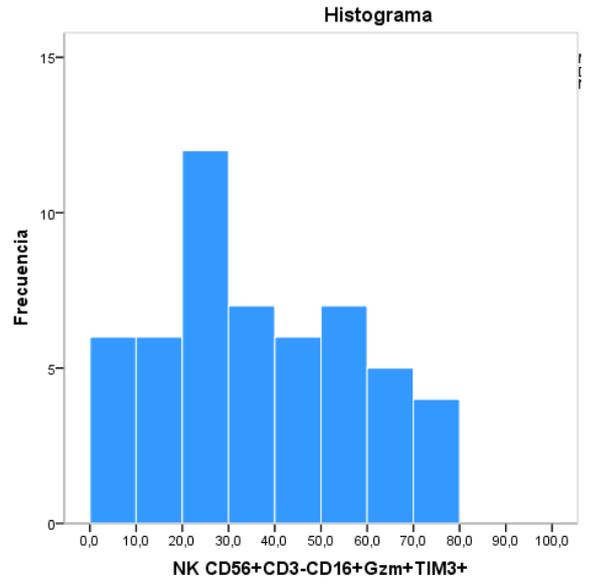
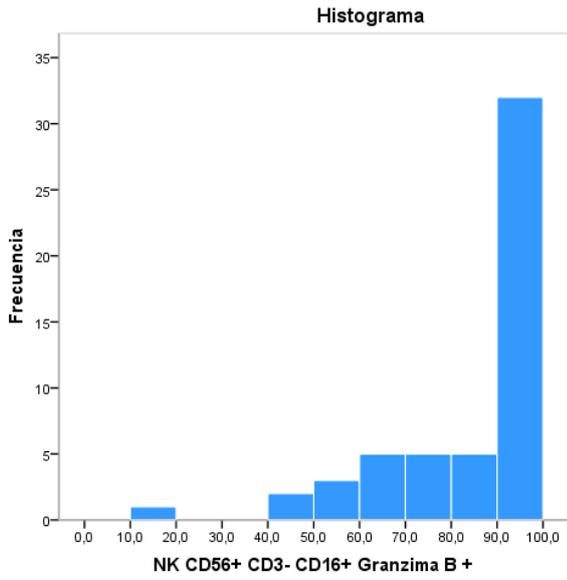
Tal y como se puede apreciar en los datos que aparecen en la tabla 5, el tanto por ciento de células NK CD56^{dim} activadas (gzmB⁺) que expresaban diferentes puntos de control (LAG3, TIM3, PD1) fue muy superior a las correspondientes poblaciones exhaustas (gzmB⁻) lo que sugiere una movilización en la activación de las células NK. Curiosamente, el tanto por ciento de células NK activas que expresaban PD-1 era muy inferior a las que expresaban TIM3 o LAG3.

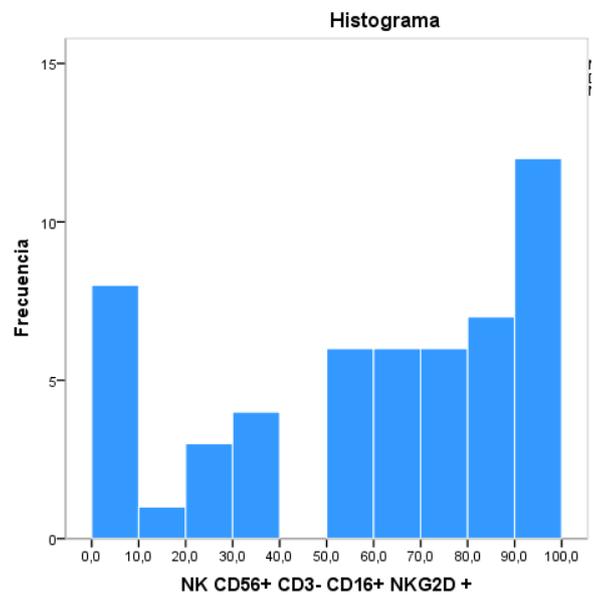
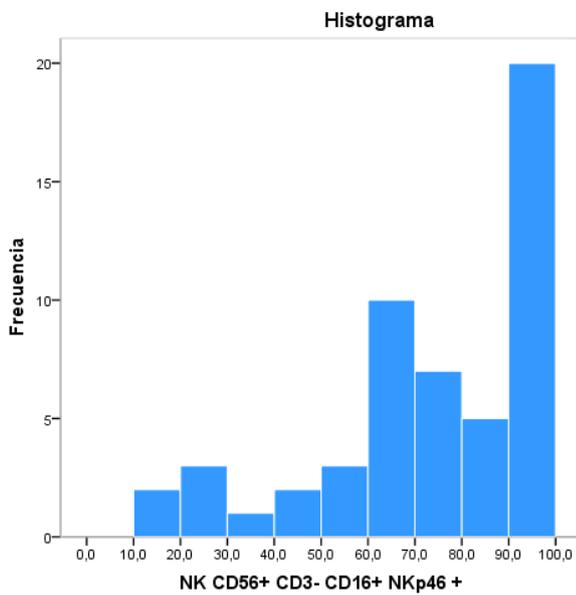
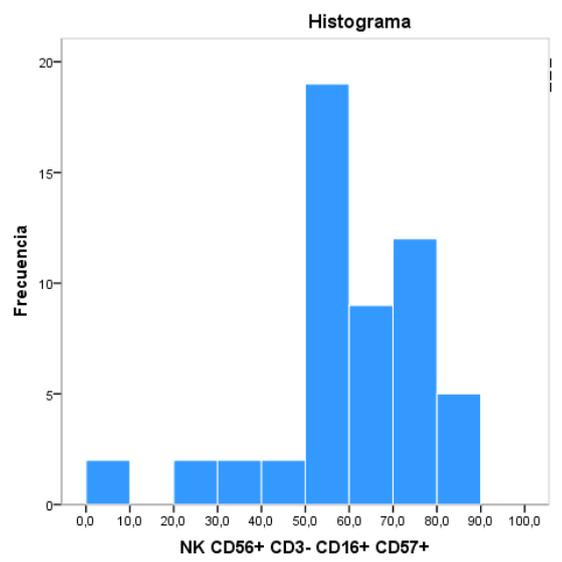
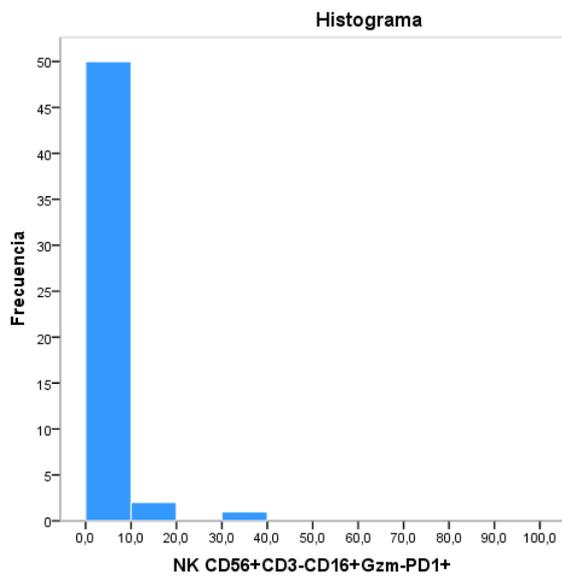
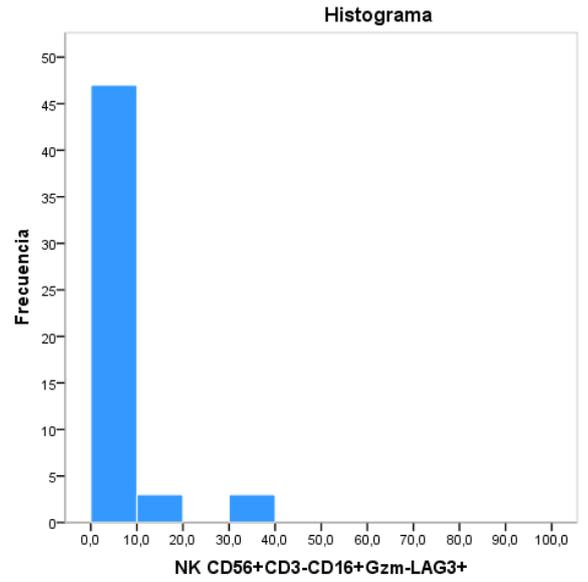
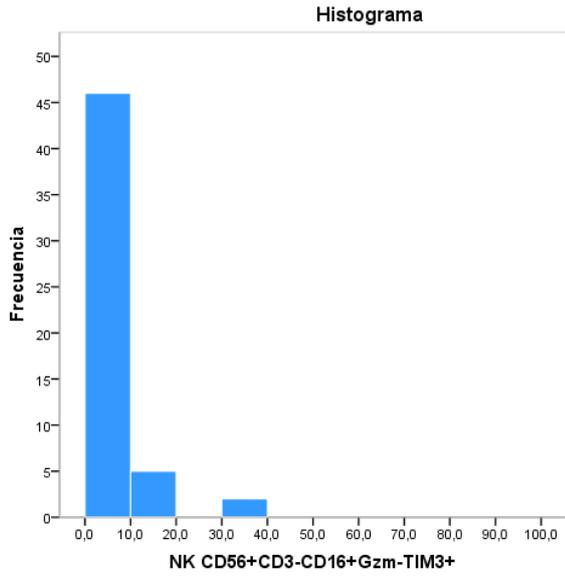
En cuanto a la expresión de receptores activadores e inhibidores, hubo una mayor expresión de los primeros (59.8% CD57⁺ 74.2% NKp46⁺, 69% NKG2D⁺) con respecto a los segundos (45.9% NKG2A⁺). Esto indica una mayor proporción de células NK activadas y altamente diferenciadas.

En cuanto a las células NKT, células con capacidades citotóxicas y funciones tanto de NK como de linfocitos T, existían en un pequeño porcentaje (7.5%) en nuestra muestra.

A continuación, pueden observarse de una manera más concreta y detallada los histogramas de distribución de cada una de las poblaciones explicadas previamente (figura 11)







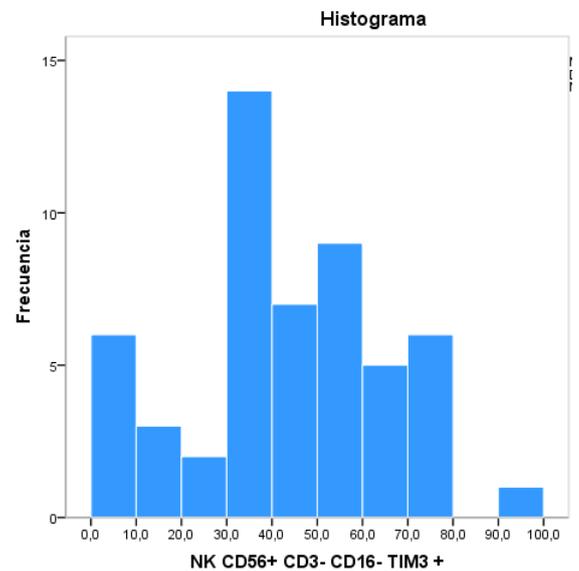
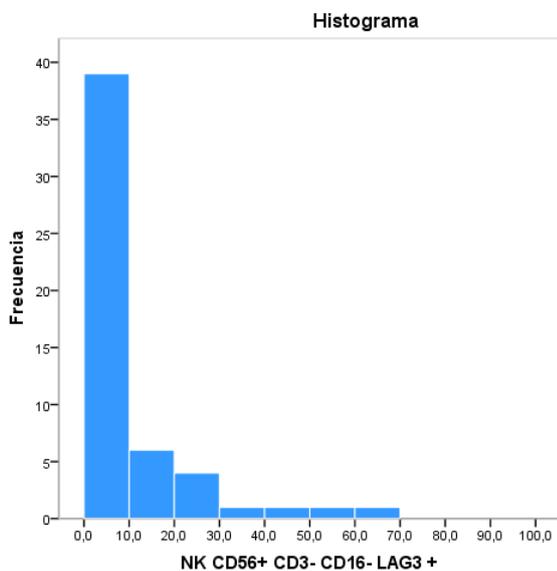
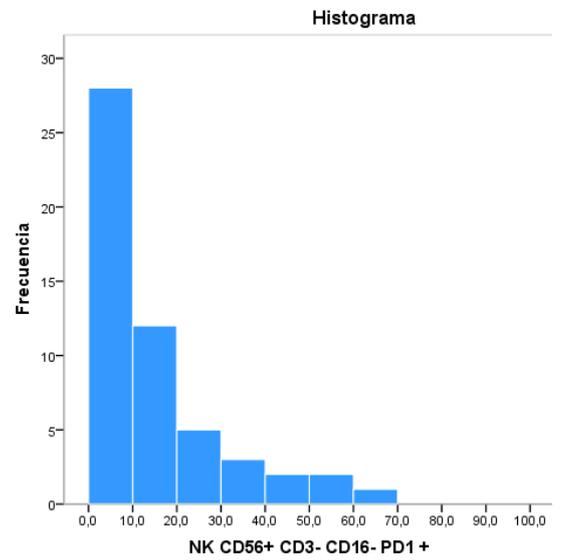
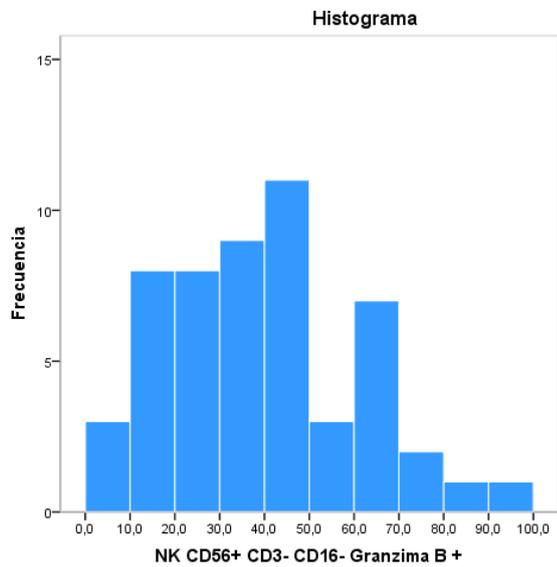
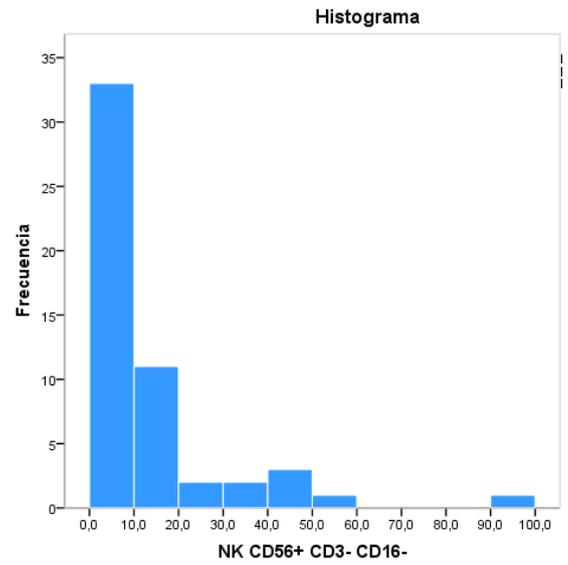
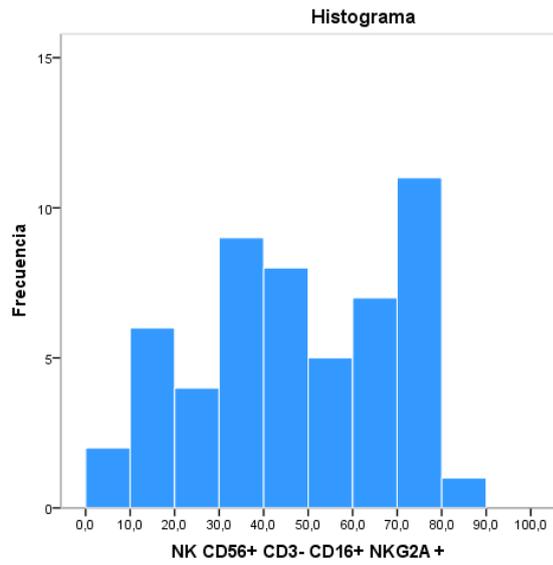


Figura 11: Histogramas de distribución de las diferentes poblaciones de células NK

4.1.4 Otras determinaciones

La lactato deshidrogenasa (LDH) es un enzima que interviene en reacciones metabólicas que conducen a la obtención de energía, y se encuentra en casi todas las células del organismo. En sangre, tan solo existen pequeñas cantidades de LDH. Cuando existe daño o destrucción celular o tisular, las células liberan LDH hacia la sangre. Por esta razón, la LDH puede usarse como marcador inespecífico de lesión celular o tisular de cualquier parte del organismo.

En nuestra muestra, la LDH tiene una mediana de 202 U/L con una desviación típica de 218.6 U/L y una distribución que se detalla en la figura 12. El 36.4% de los pacientes tenían un valor superior al límite superior de la normalidad (214 U/L).

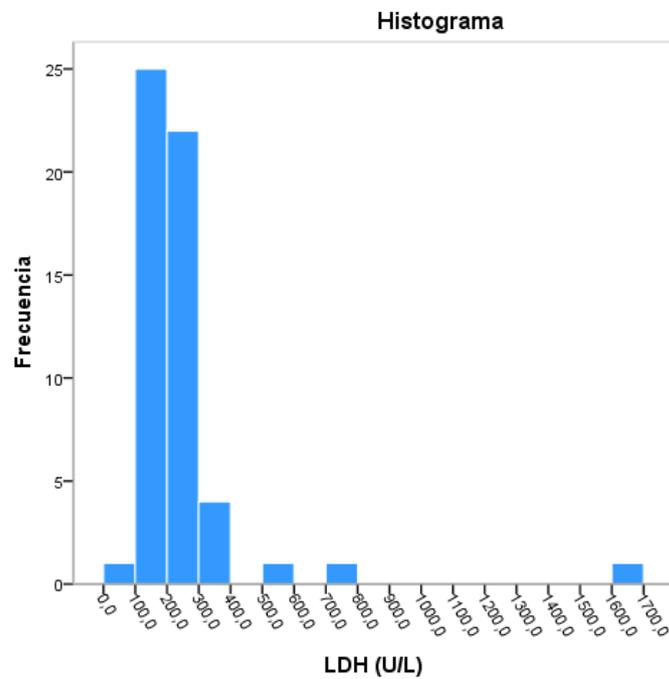


Figura 12: Distribución de los valores de LDH en suero

En cuanto a la expresión de PD-L1 en las células analizadas en nuestra muestra, correspondiente a biopsias de tejido tumoral, puede observarse en la figura 13 que un 34% su expresión era $\geq 50\%$, un 21.3% menor del 1% y un 44.7% entre 1-49%. PD-L1, es una proteína que actúa como un inhibidor de la respuesta inmunitaria. Puede encontrarse expresada en células normales pero suele encontrar en cantidades más altas de lo normal en las células tumorales.

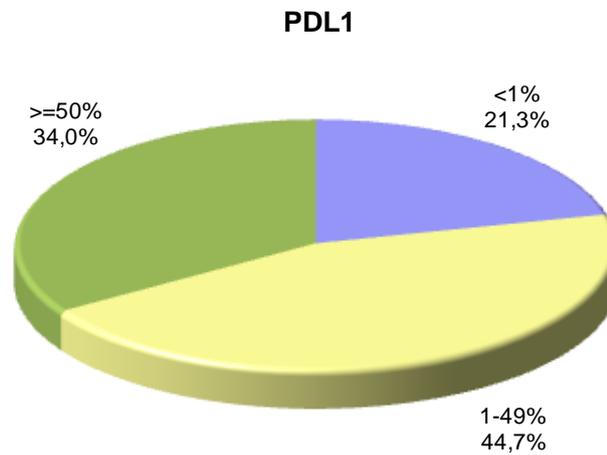


Figura 13: Distribución de los valores de PDL-1 determinados mediante inmunohistoquímica en tejido tumoral

4.2 Análisis de supervivencia

Dentro del análisis de supervivencia, se ha analizado la SLP definida como el tiempo expresado en meses que los pacientes tardan en progresar al tratamiento con inmunoterapia. Tal y como puede observarse en la figura 14, la mediana de SLP fue de 10 meses (2.81-17.19).

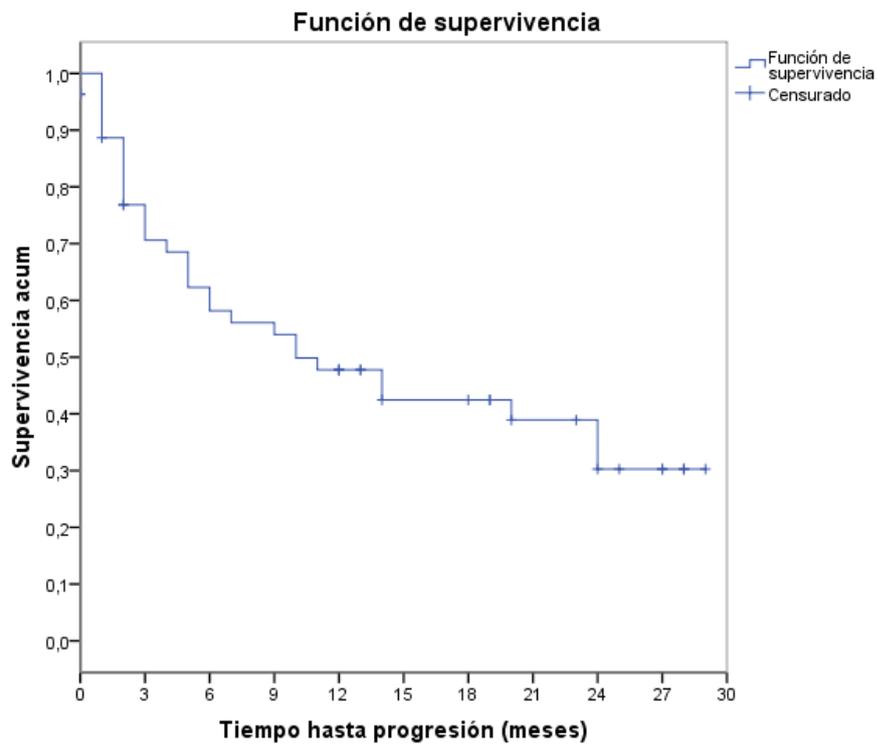


Figura 14: Análisis de Supervivencia Libre de Progresión

En cuanto a la SG, expresada en meses puede observarse en la figura 15. La mediana fue de 19 meses (11.13-26.87).

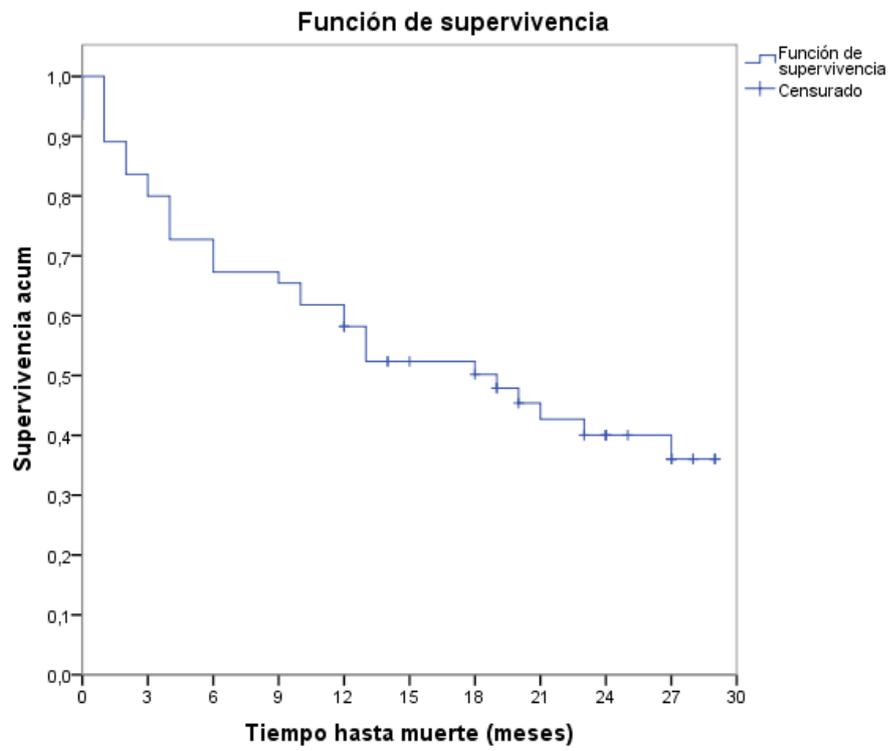


Figura 15: Análisis de Supervivencia Global

4.3 Análisis inferencial

4.3.1 Características de los pacientes y de la enfermedad tumoral.

Se ha realizado un análisis inferencial entre las distintas variables recogidas y la SG que se detalla a continuación.

La intención de este análisis es poder analizar qué variables de las estudiadas, tienen un impacto en SG y por tanto relacionan su presencia o expresión con una mayor respuesta al tratamiento con inmunoterapia.

Si analizamos la edad, tal y como puede observarse en la figura 16, no existe una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.065$) entre los mayores y menores de 75 años, aunque sí una clara tendencia a la diferenciación entre ambos grupos. Esta diferenciación se debe a la relación existente entre una mayor edad y una menor SG.

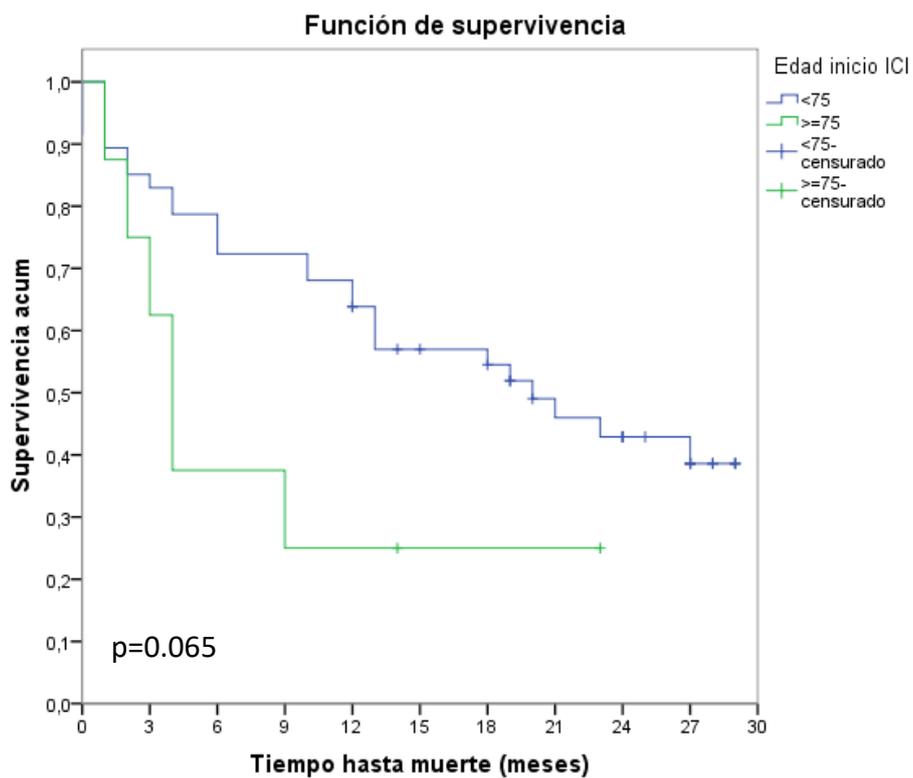


Figura 16: Análisis de SG según la edad

Tampoco existen diferencias en el sexo ($p=0.396$) (figura 17) ni en el consumo de tabaco ($p=0.165$) (figura 18) siendo esta última posiblemente resultado de la desproporción evidente que existe entre ambos grupos comparativos.

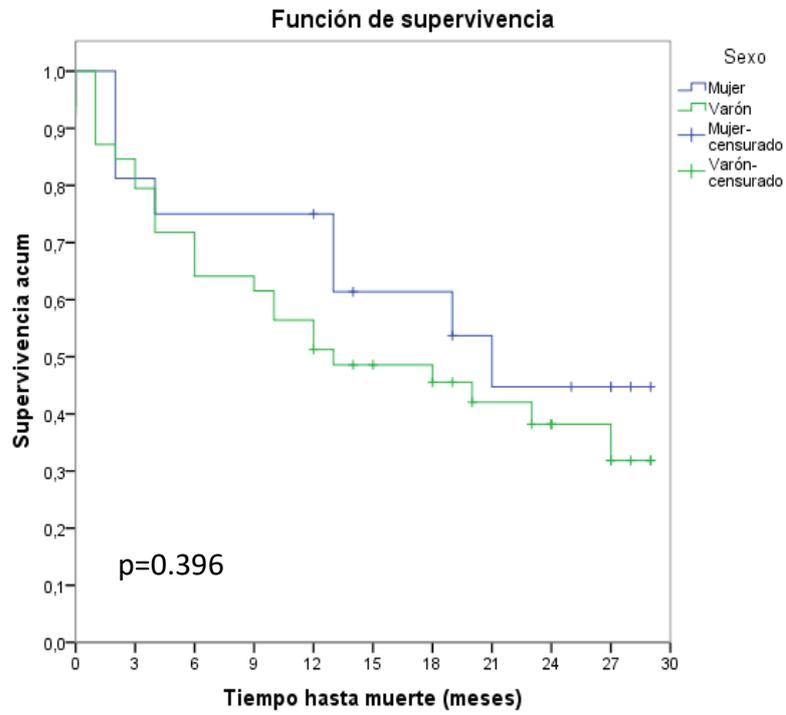


Figura 17: Análisis de SG según el sexo

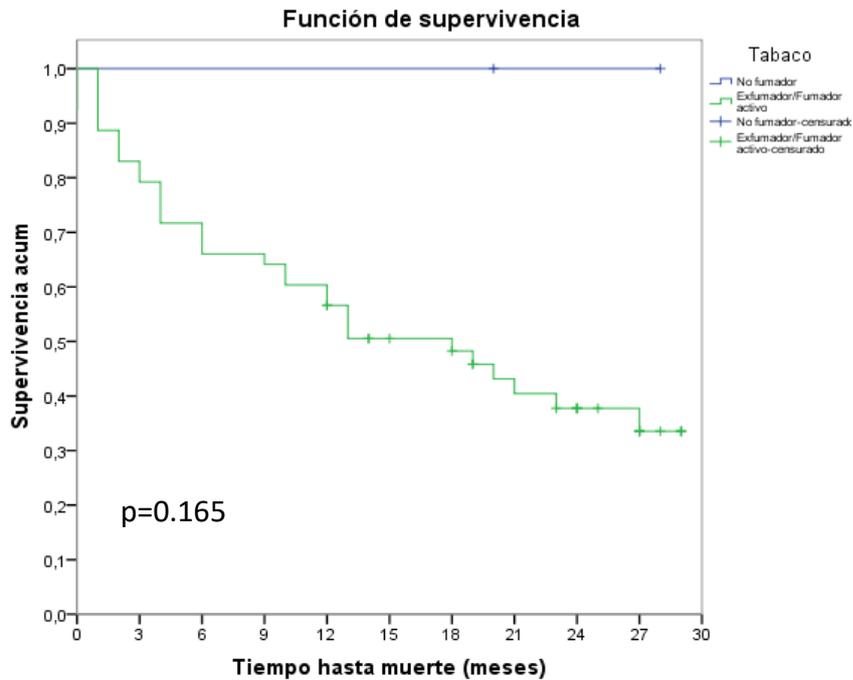


Figura 18: Análisis de SG según el consumo de tabaco

El ECOG es una escala que permite medir de una manera práctica la calidad de vida de un paciente. Valora la evolución de las capacidades del paciente en su vida diaria manteniendo al máximo su autonomía. Este dato es muy importante cuando se plantea un tratamiento, ya que de esta escala dependerá el protocolo terapéutico y el pronóstico de la enfermedad. La escala ECOG se puntúa de 0 a 5 y sus valores pueden verse en la tabla 6.

ECOG 0	El paciente se encuentra totalmente asintomático y es capaz de realizar un trabajo y actividades normales de la vida diaria.
ECOG 1	El paciente presenta síntomas que le impiden realizar trabajos arduos, aunque se desempeña normalmente en sus actividades cotidianas y en trabajos ligeros. El paciente sólo permanece en la cama durante las horas de sueño nocturno.
ECOG 2	El paciente no es capaz de desempeñar ningún trabajo, se encuentra con síntomas que le obligan a permanecer en la cama durante varias horas al día, además de las de la noche, pero que no superan el 50% del día. El individuo satisface la mayoría de sus necesidades personales solo.
ECOG 3	El paciente necesita estar encamado más de la mitad del día por la presencia de síntomas. Necesita ayuda para la mayoría de las actividades de la vida diaria como por ejemplo el vestirse.
ECOG 4	El paciente permanece encamado el 100% del día y necesita ayuda para todas las actividades de la vida diaria, como por ejemplo la higiene corporal, la movilización en la cama e incluso la alimentación.
ECOG 5	Fallecido.

Tabla 6: Descripción de los diferentes valores de la escala ECOG desde el 0 (paciente autónomo) hasta el 5 (paciente fallecido)

En cuanto al análisis del ECOG en nuestra muestra, únicamente se incluyeron pacientes con ECOG 0 ó 1, dado que con un ECOG superior el tratamiento con inmunoterapia está contraindicado. Analizando las diferencias en SG entre ambos, puede observarse una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) entre los pacientes con un ECOG 0 y los que tienen un ECOG 1, siendo estos últimos los que obtienen un tiempo de supervivencia menor.

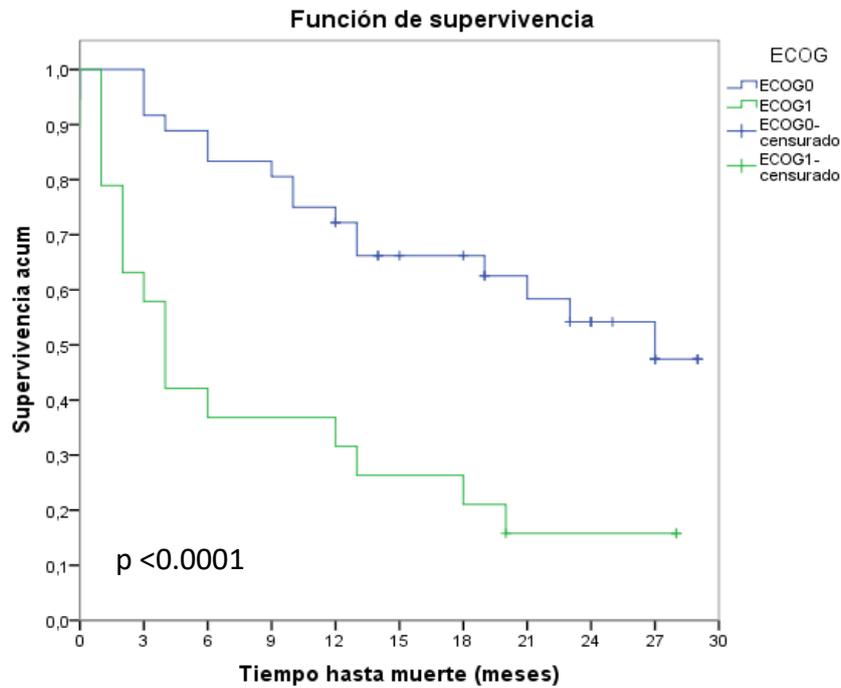


Figura 19: Análisis de SG según el ECOG

Analizando las características tumorales, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las diferentes histologías ($p=0.48$) (figura 20) pero sí se aprecia una diferencia entre los pacientes con un estadio III y un estadio IV ($p<0.0001$) (figura 21). Esta diferencia también está en concordancia con lo ya estudiado, ya que pacientes con un estadio más avanzado, como es el estadio IV, tiene menor SG que aquellos con un estadio III, o localizados, en los que se puede plantear un tratamiento más radical.

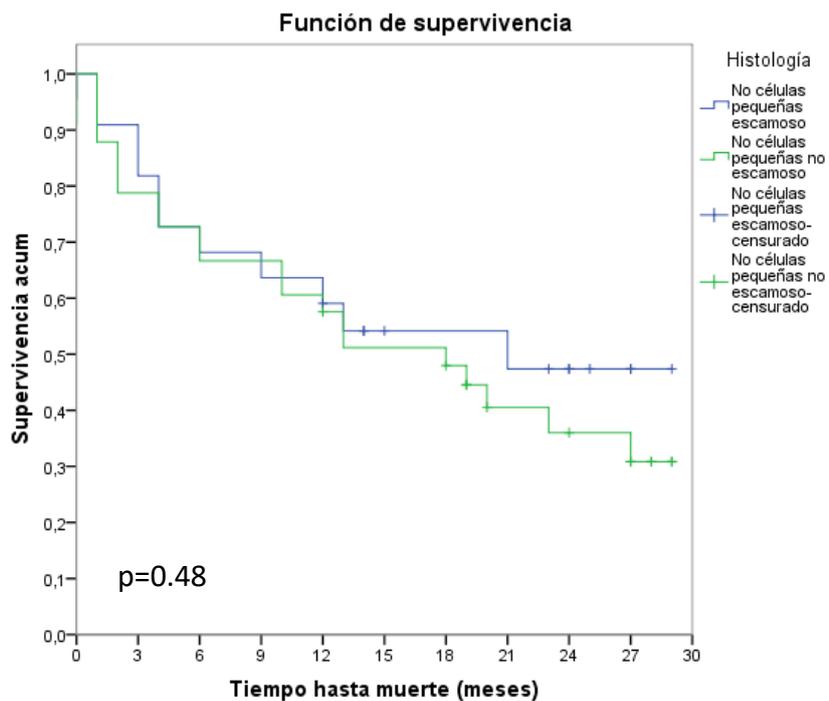


Figura 20: Análisis de SG según las diferentes histologías

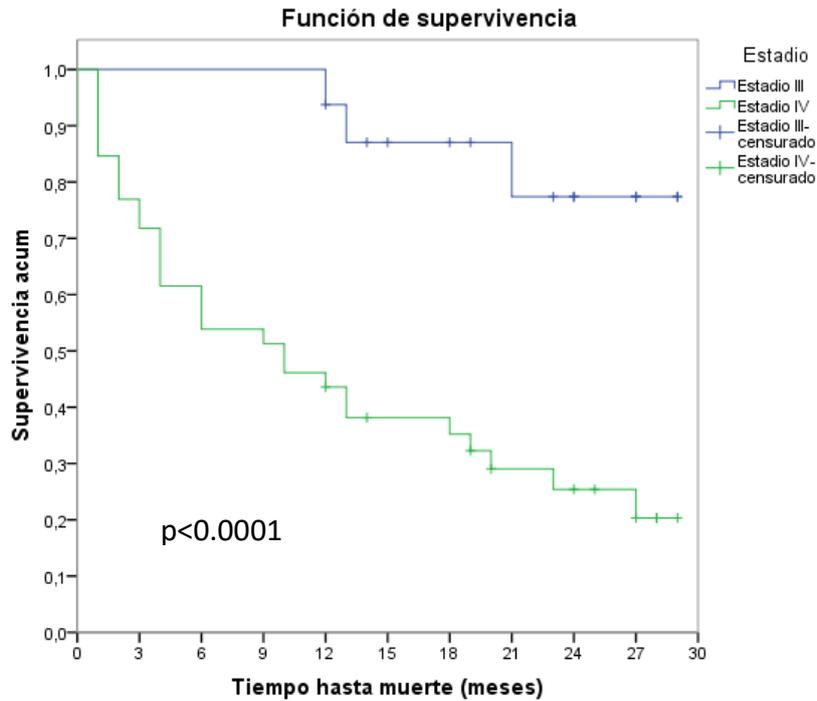


Figura 21: Análisis de SG según el estadio

En cuanto a la indicación de tratamiento, en la figura 22 se aprecia una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p < 0.0001$). Comparando los grupos dos a dos, se concluye que las diferencias en la supervivencia son significativas entre los grupos localmente avanzados y primera línea ($p = 0,019$) y líneas sucesivas ($p < 0,0001$); lo mismo ocurre con la primera línea y líneas sucesivas ($p = 0,016$).

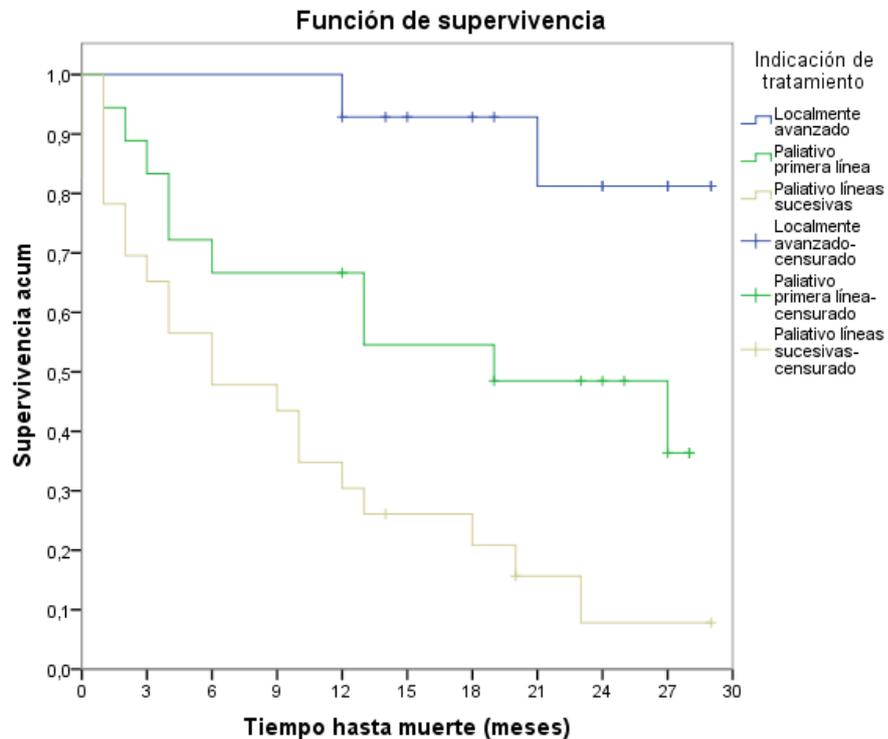


Figura 22: Análisis de SG según la indicación de tratamiento

Teniendo en cuenta el tipo de inmunoterapia recibida, también se observan diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos ($p < 0.0001$). Comparando los grupos dos a dos, se concluye que las diferencias en la supervivencia son significativas entre Pembrolizumab con Atezolizumab ($p = 0,006$) y Durvalumab ($p = 0,011$); lo mismo ocurre con Atezolizumab y Durvalumab ($p < 0,0001$). (figura 23)

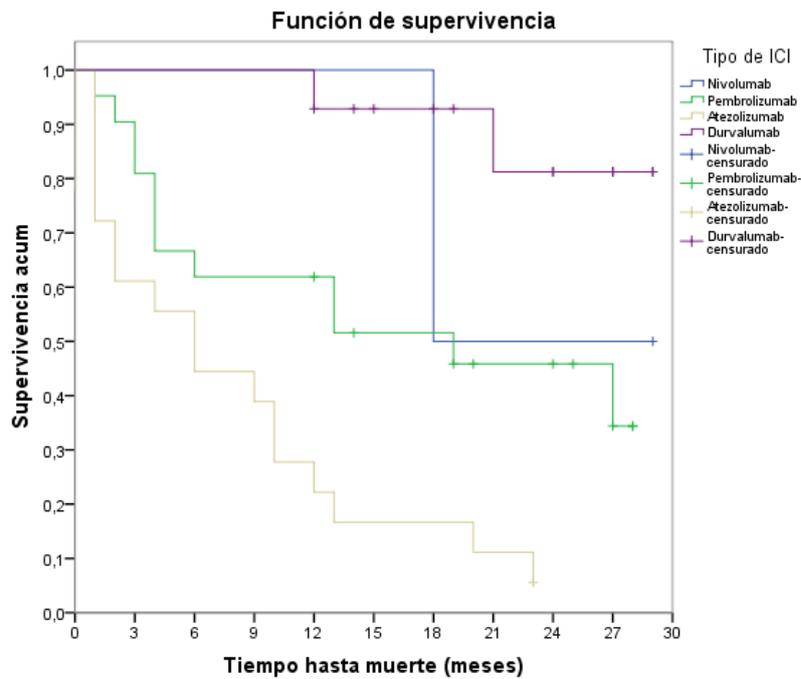


Figura 23: Análisis de SG según el tipo de inmunoterapia recibida

Analizando las diferencias en la mejor respuesta obtenida, se aprecia una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p < 0.0001$). Comparando los grupos dos a dos, se concluye que las diferencias en la supervivencia son significativas entre PR con todos los demás grupos: con RC ($p < 0,0001$), con RP ($p < 0,0001$), con EE ($p = 0,002$) y con No Evaluable ($p < 0,0001$); lo mismo ocurre con No evaluable y RC ($p < 0,0001$), RP ($p < 0,0001$) y EE ($p < 0,0001$); además hay diferencias entre RC y EE ($p = 0,017$). (figura 24)

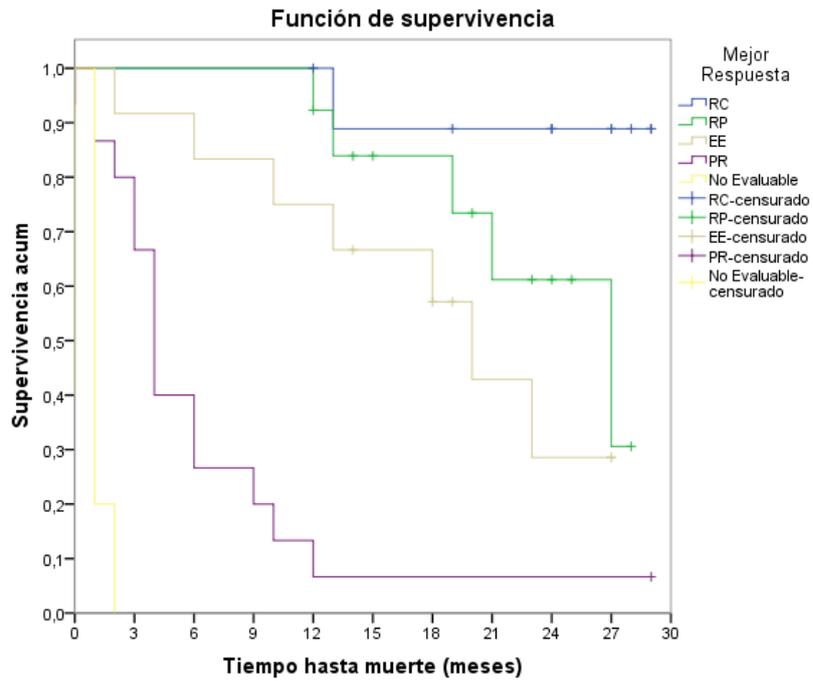
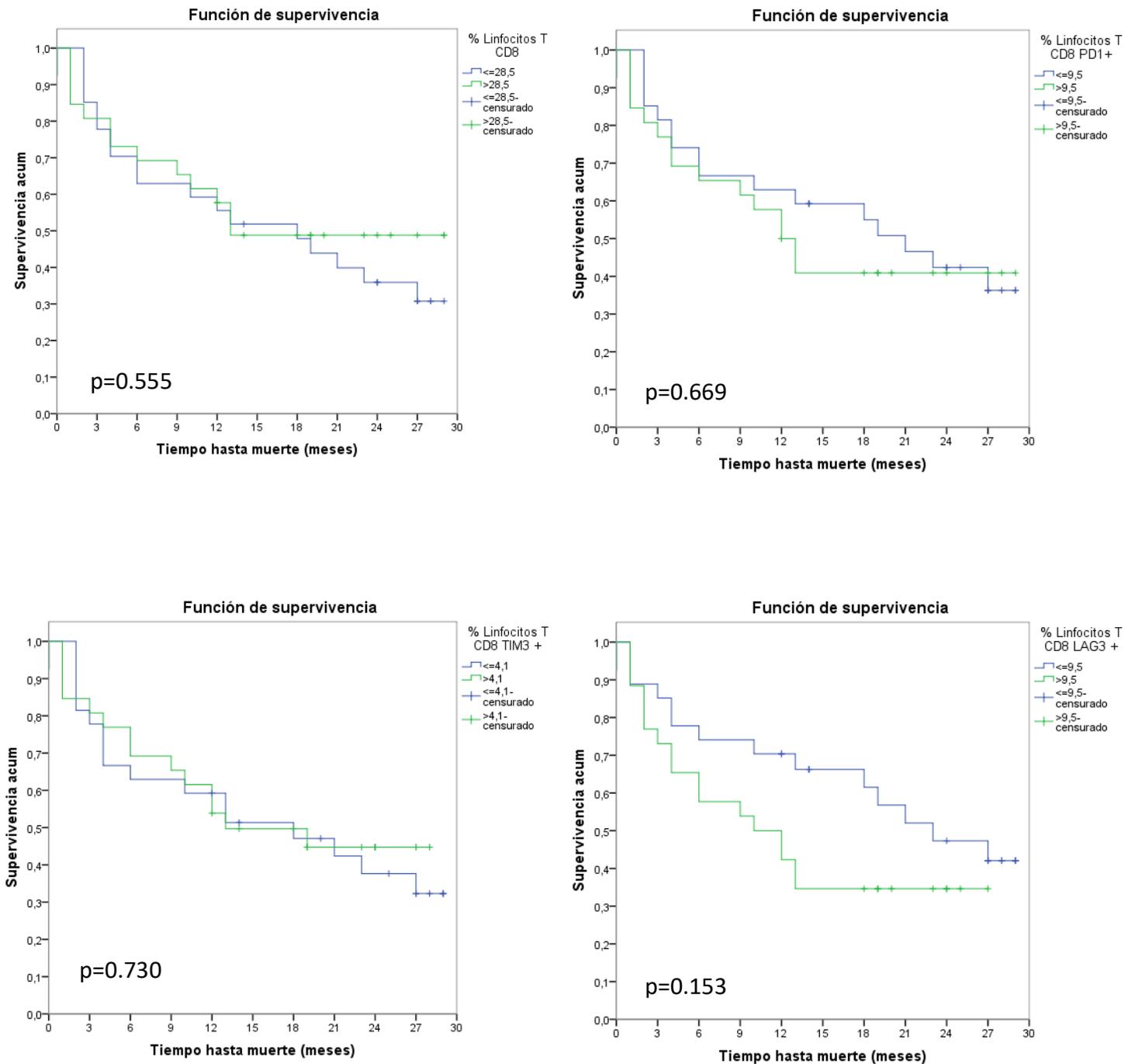


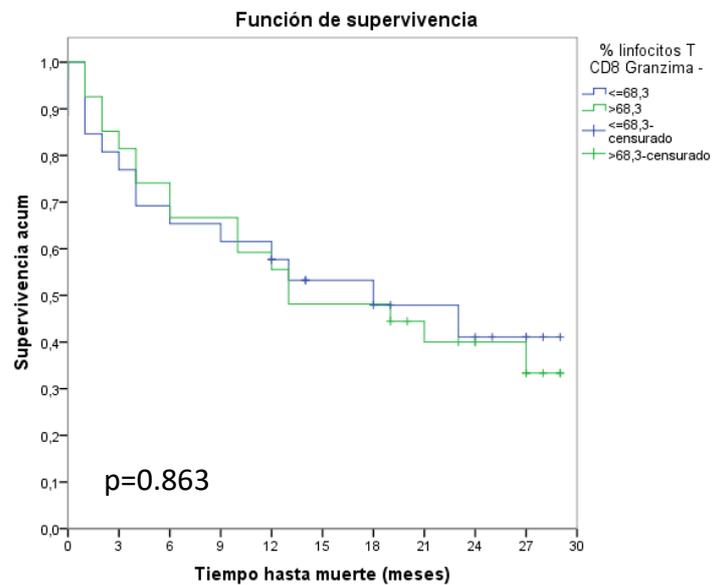
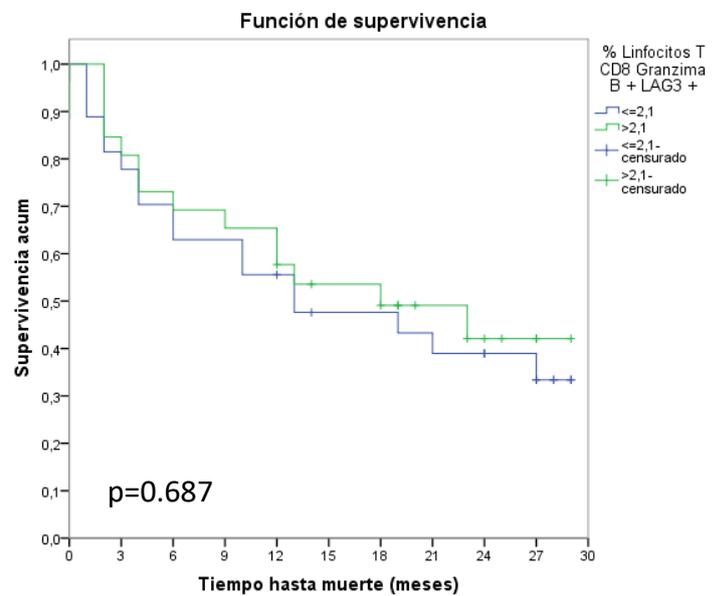
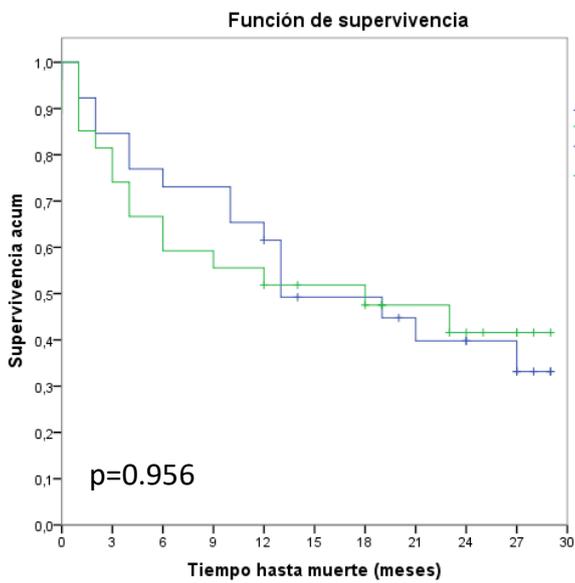
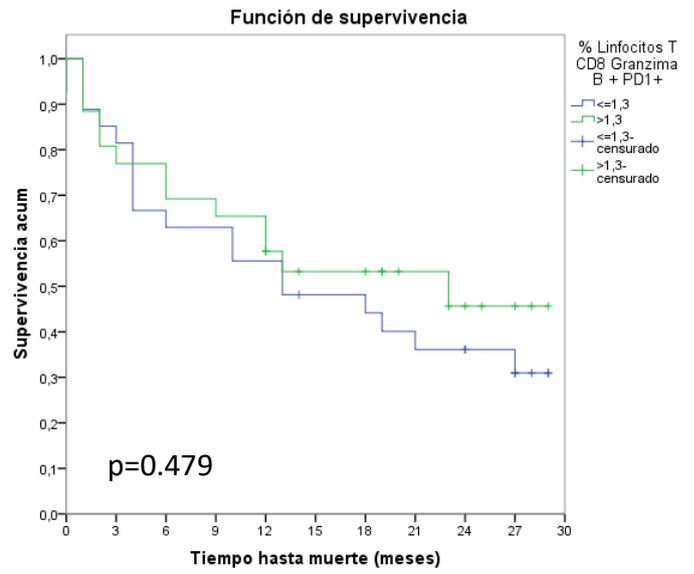
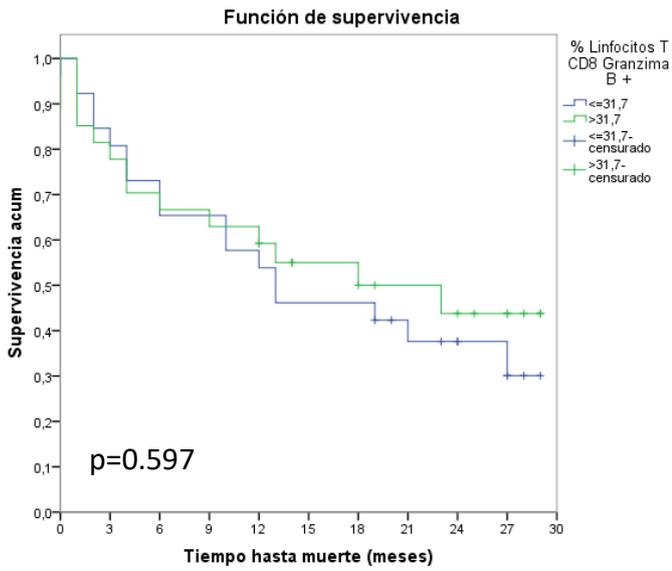
Figura 24: Análisis de SG según la mejor respuesta obtenida

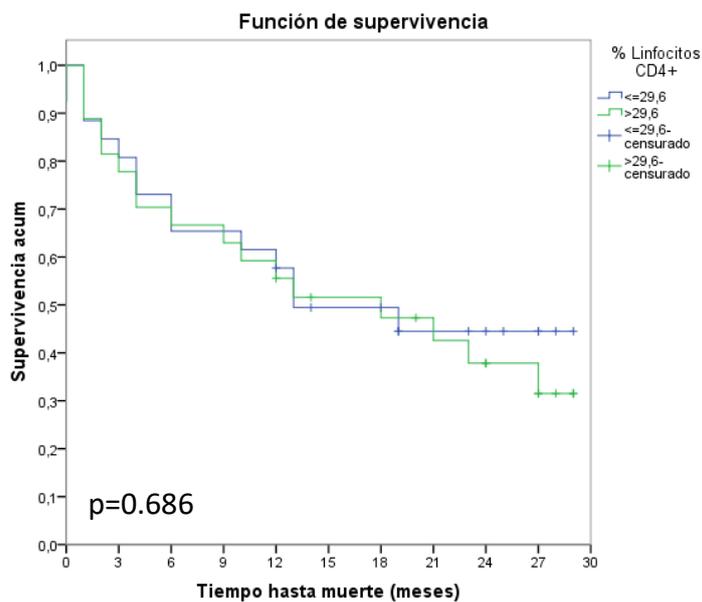
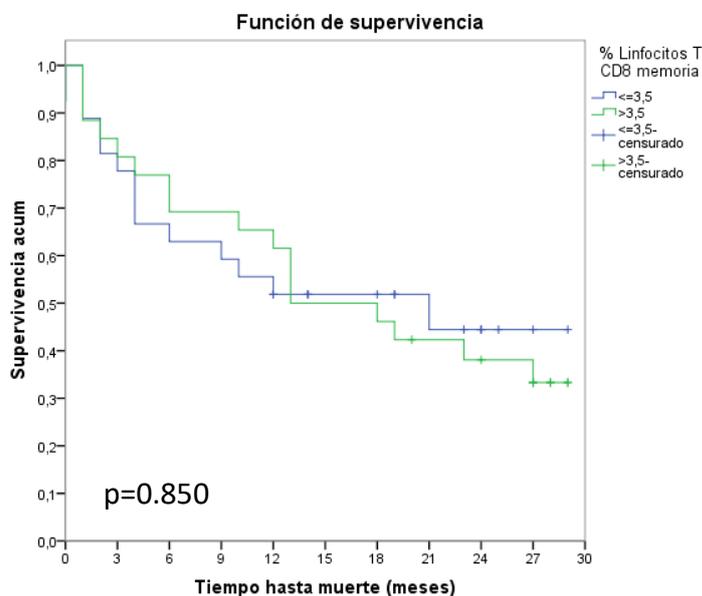
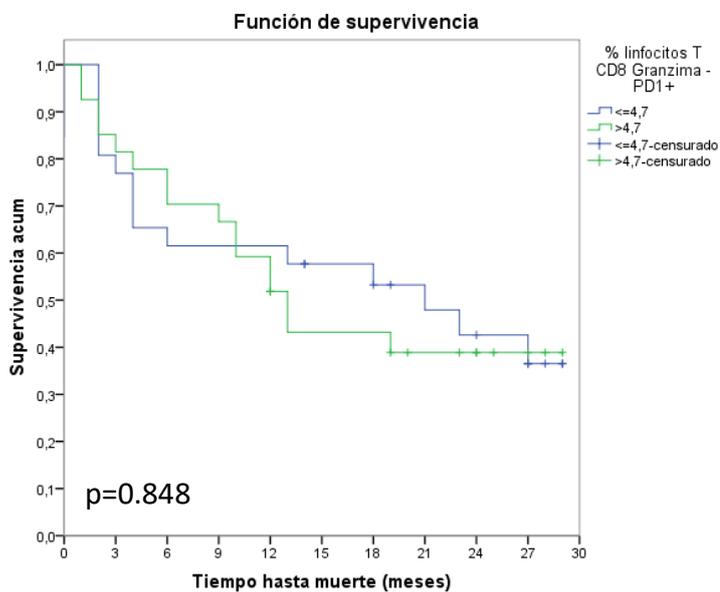
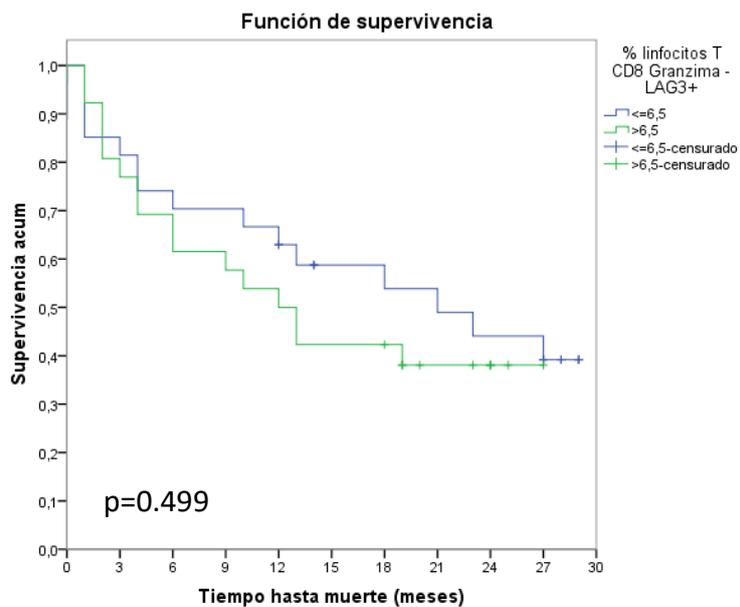
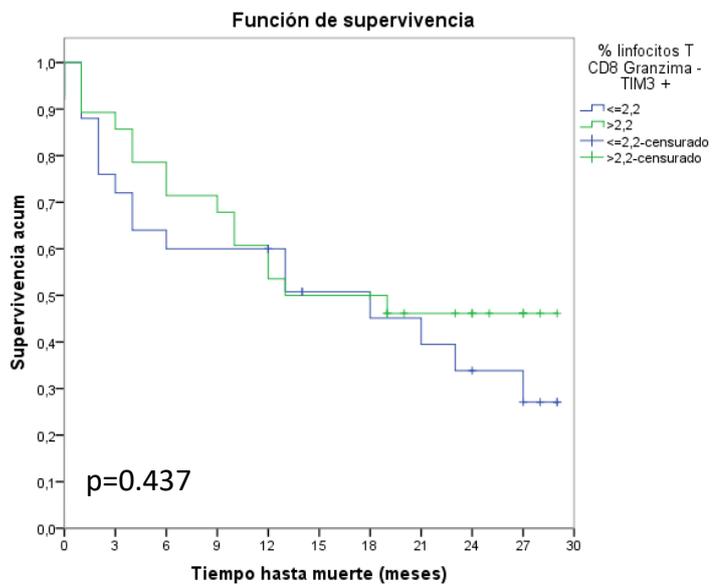
4.3.2 Poblaciones de linfocitos

A continuación, se muestran las curvas de supervivencia Kaplan Meier de las distintas poblaciones linfocitarias divididas cada una de ellas en dos grupos, según la mediana.

Tal y como ha podido observarse en la figura 25, no existen diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las poblaciones, aunque sí se ha identificado una tendencia a la diferenciación entre ambos grupos en las poblaciones de linfocitos TCD8⁺LAG3⁺(p=0.153), TCD4⁺ reguladores (p=0.163), TCD4⁺ reguladores GzmB⁻(p=0.192) y, especialmente en los linfocitos TCD4⁺ reguladores GzmB⁺(p=0.091).







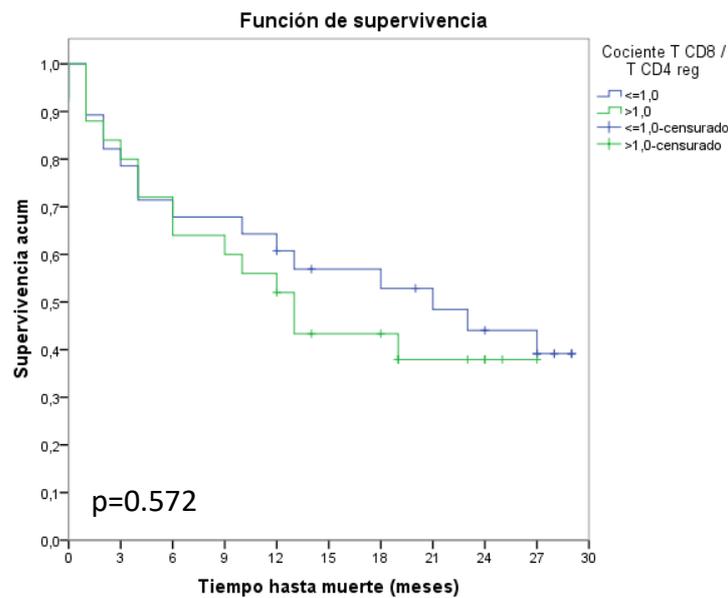
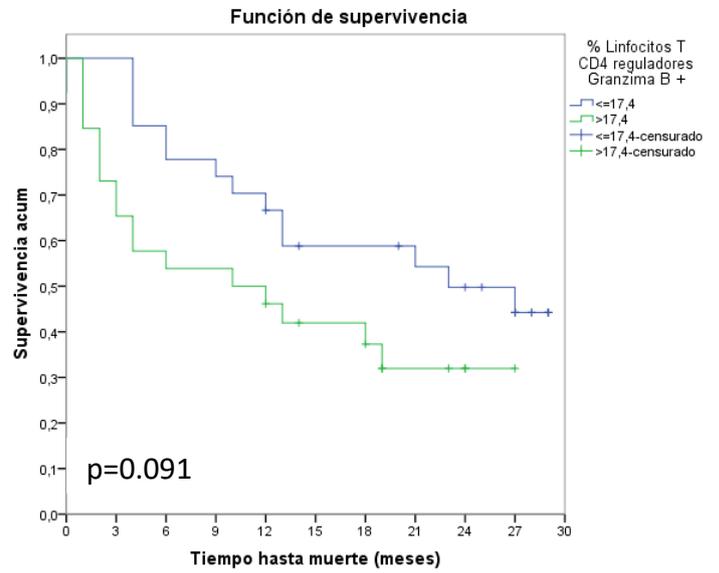
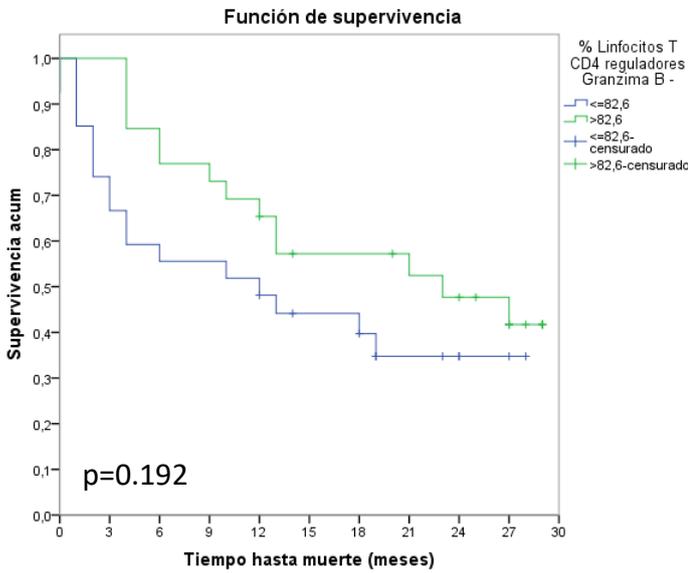
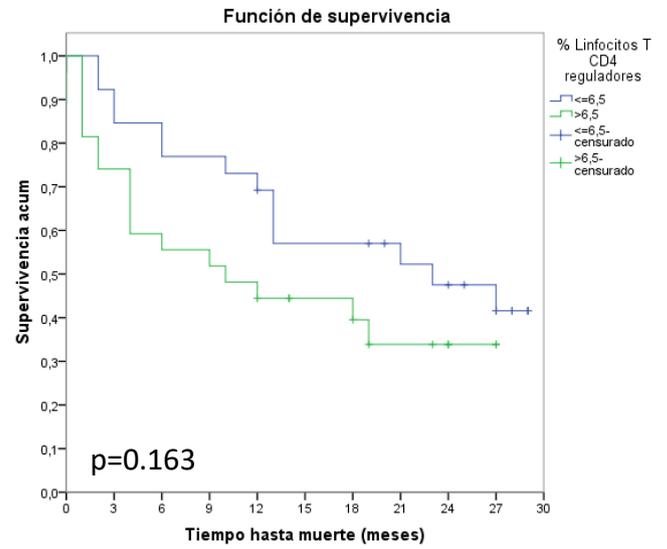
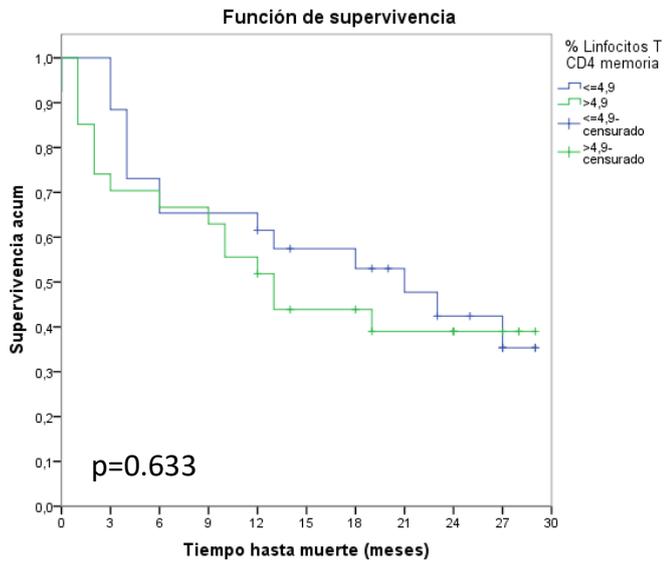


Figura 25: Análisis de SG según la proporción de las diversas poblaciones de linfocitos analizadas

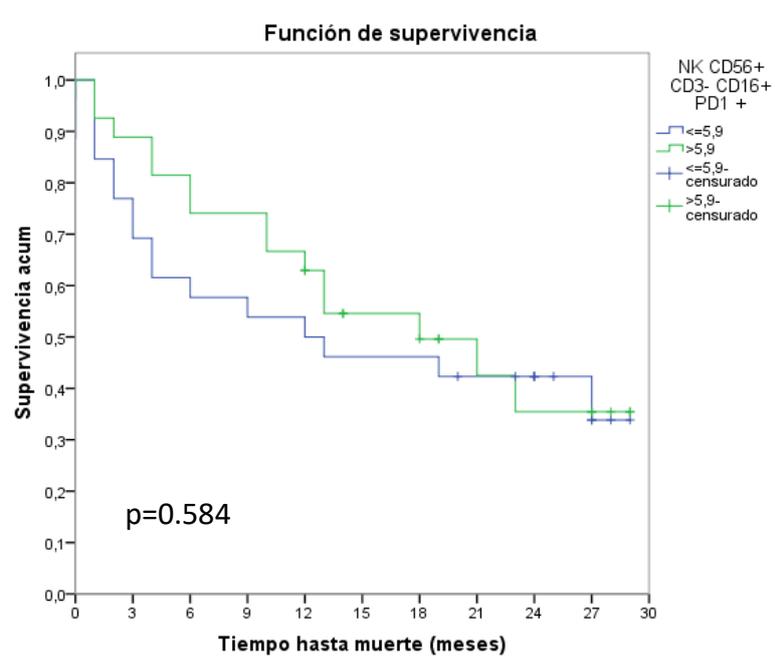
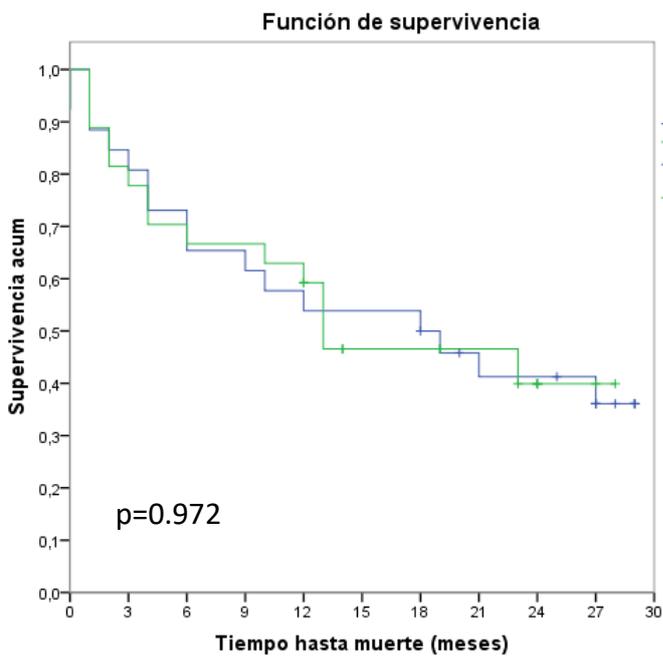
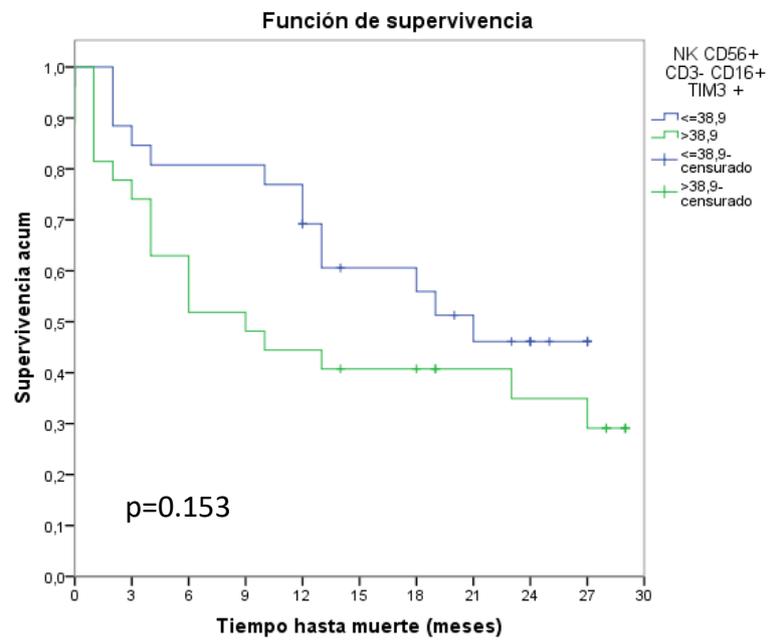
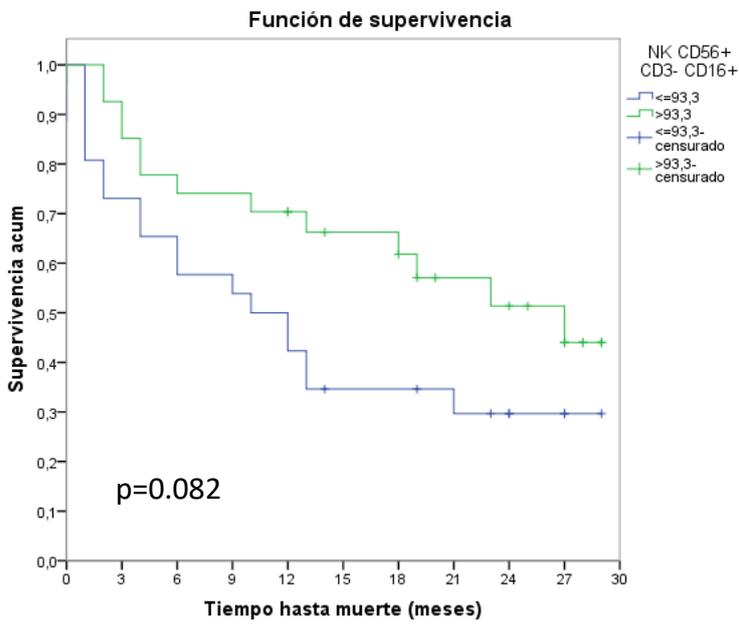
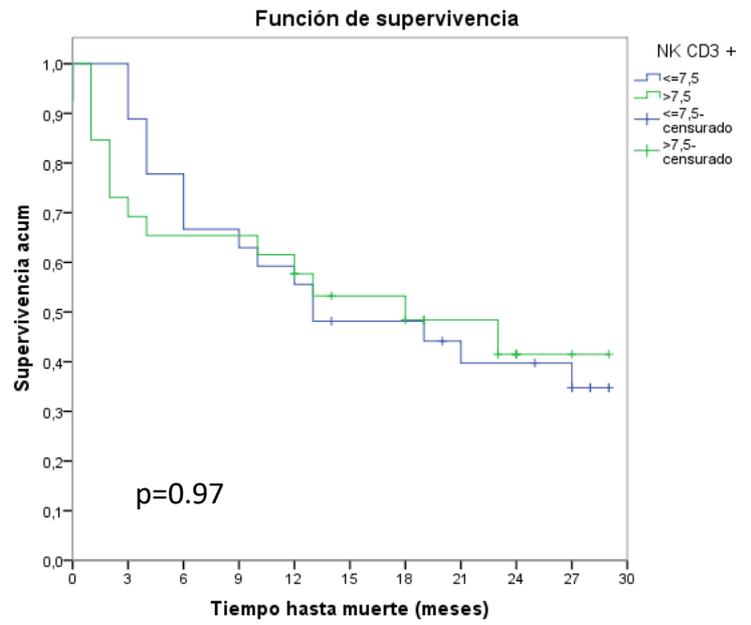
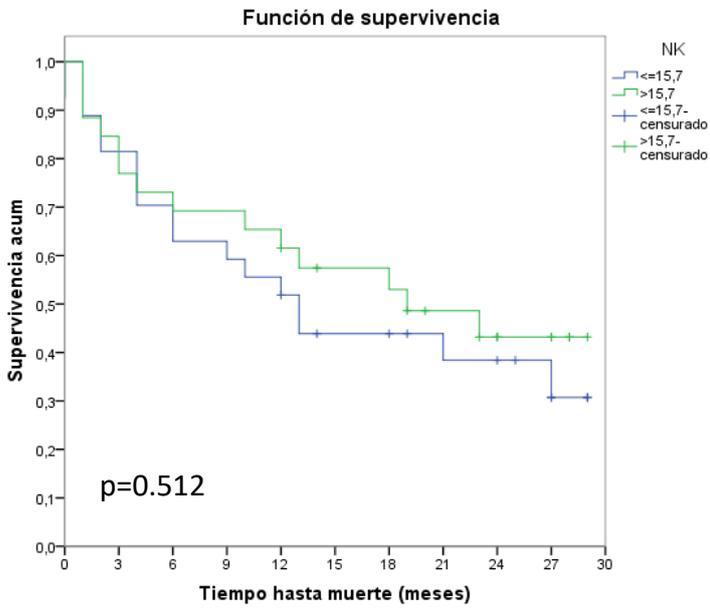
4.3.3 Poblaciones de células NK

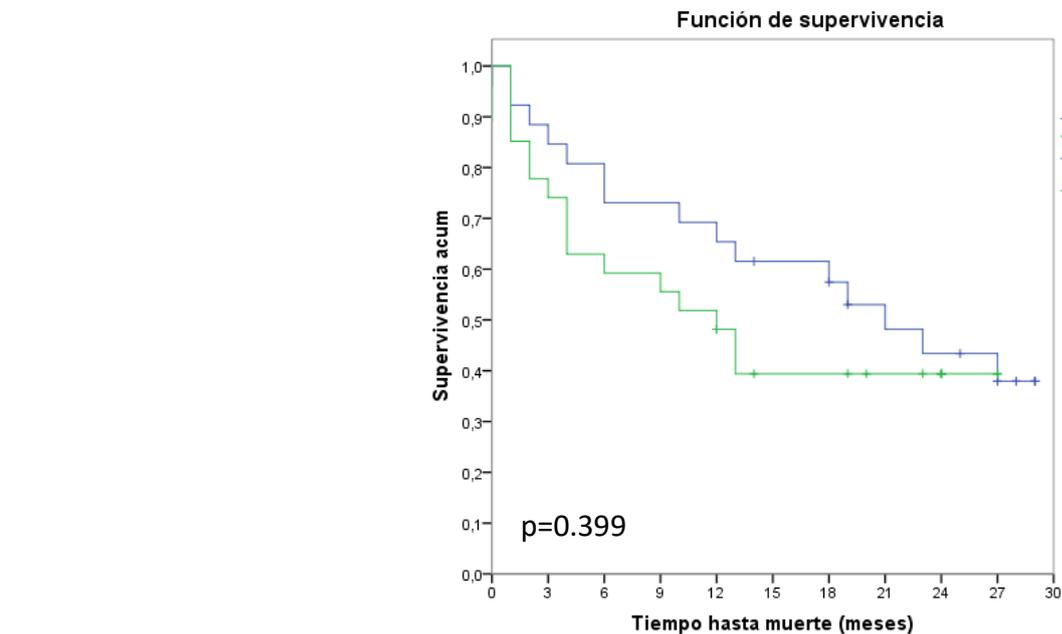
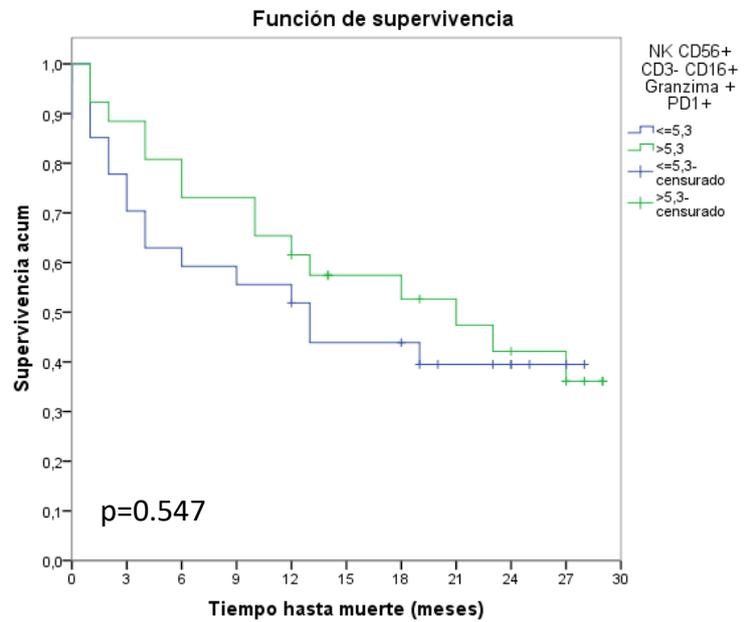
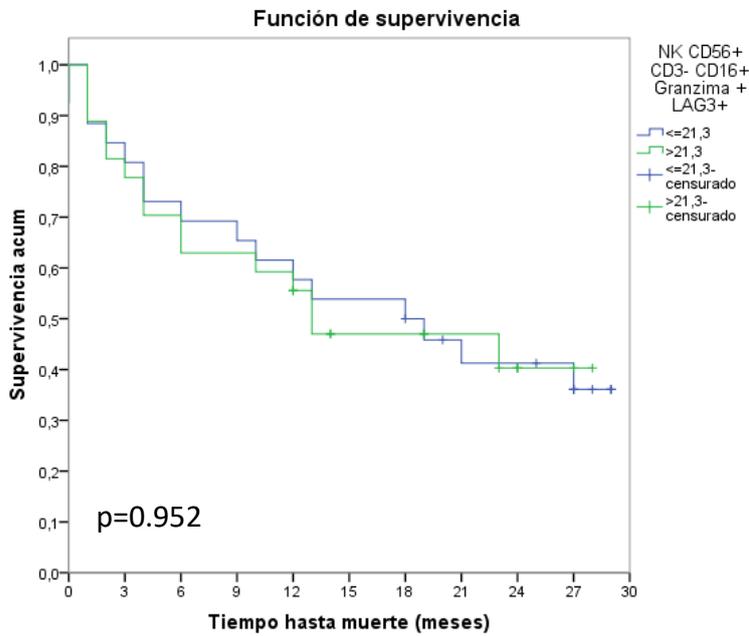
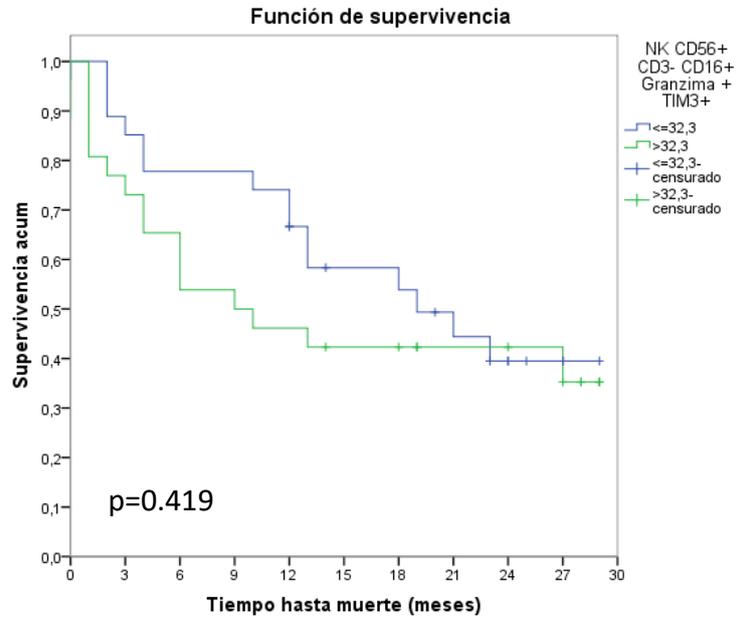
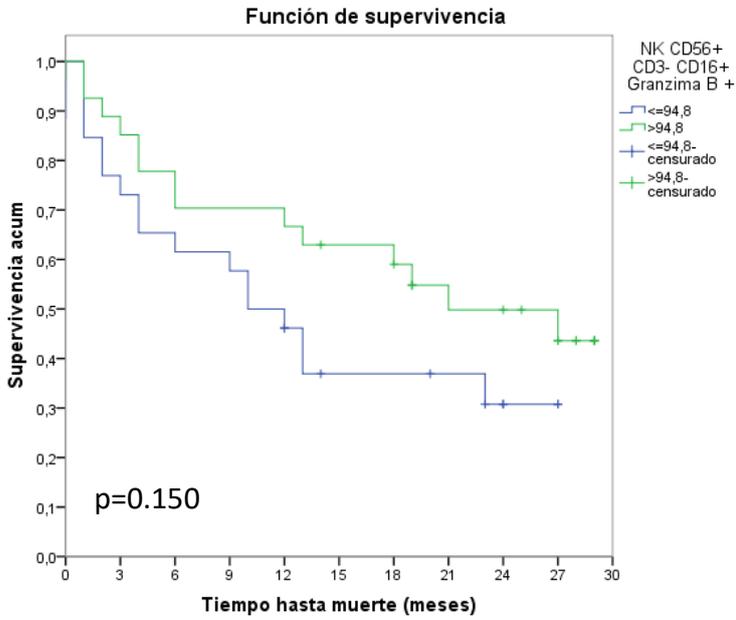
A continuación, se muestran las curvas de supervivencia Kaplan Meier de las distintas poblaciones de células NK divididas cada una de ellas en dos grupos, según la mediana.

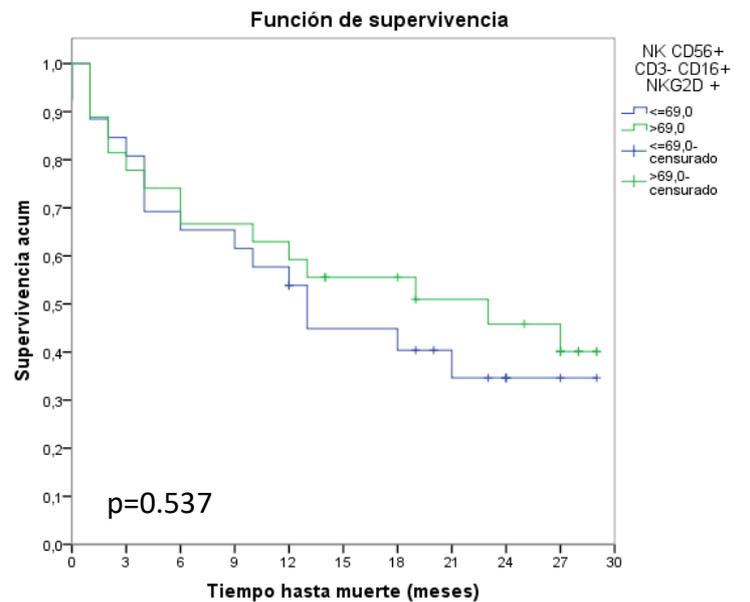
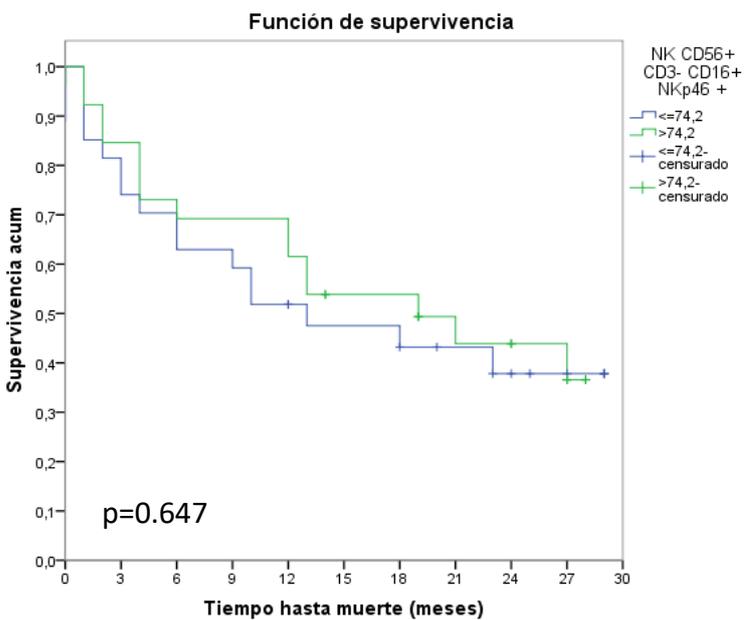
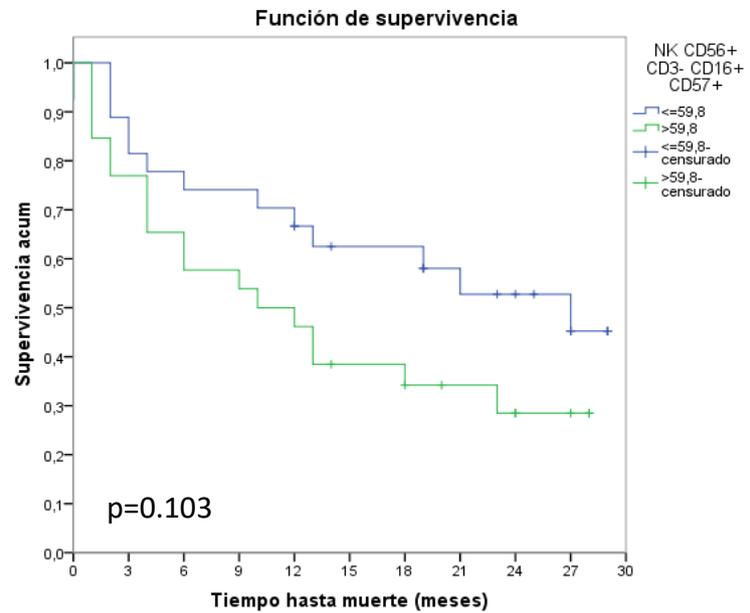
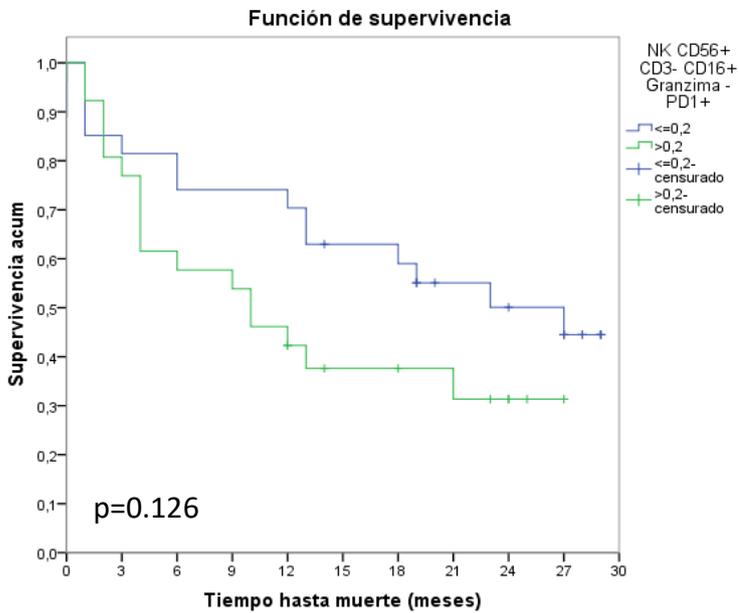
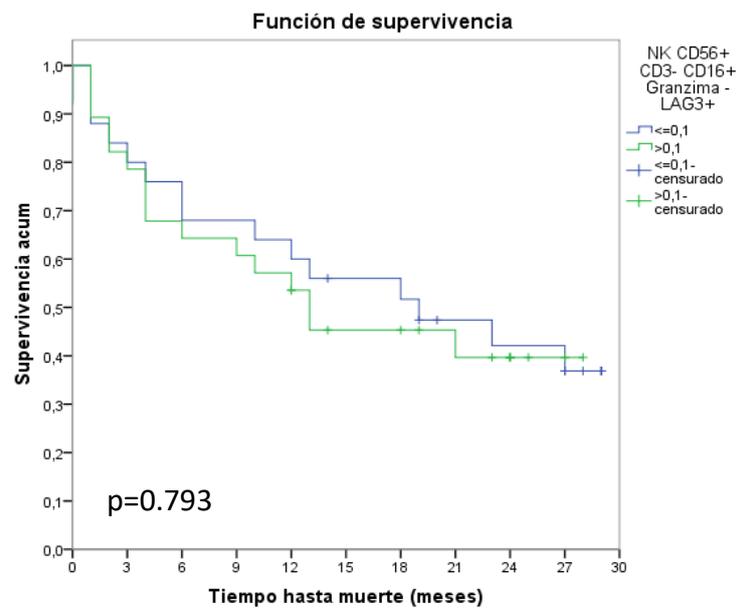
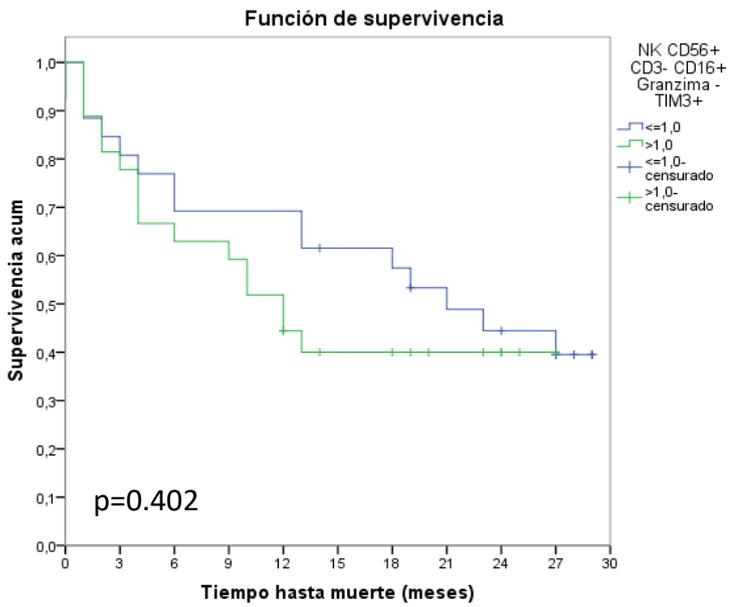
Tal y como puede observarse en la figura 26, existen diferencias estadísticamente significativas en la población de células NK CD56⁺ CD3⁻ CD16⁻ PD1⁺ teniendo una mejor SG el grupo con una menor concentración de esta población (<9.5) con una p 0.047.

Existen otras poblaciones que, aunque no alcanzan la significación estadística, sí se ha identificado una tendencia a la diferenciación entre ambos grupos. Estas poblaciones son: NK CD56⁺CD3⁻ CD16⁺ (p=0.082), NK CD56⁺CD3⁻ CD16⁺ TIM3⁺ (p=0.153), NK CD56⁺CD3⁻ CD16⁺GzmB⁺(p=0.15),NK CD56⁺ CD3⁻ CD16⁺GzmB⁻ PD-1⁺ (p:0.126), NK CD56⁺ CD3⁻ CD16⁺ CD57⁺ (p=0.103), NK CD56⁺ CD3⁻ CD16⁻ (p=0.068) y NK CD56⁺ CD3⁻ CD16⁻ GzmB⁺(p=0.085).

A continuación, pueden observarse las curvas de Kaplan Meier de cada una de las poblaciones analizadas.







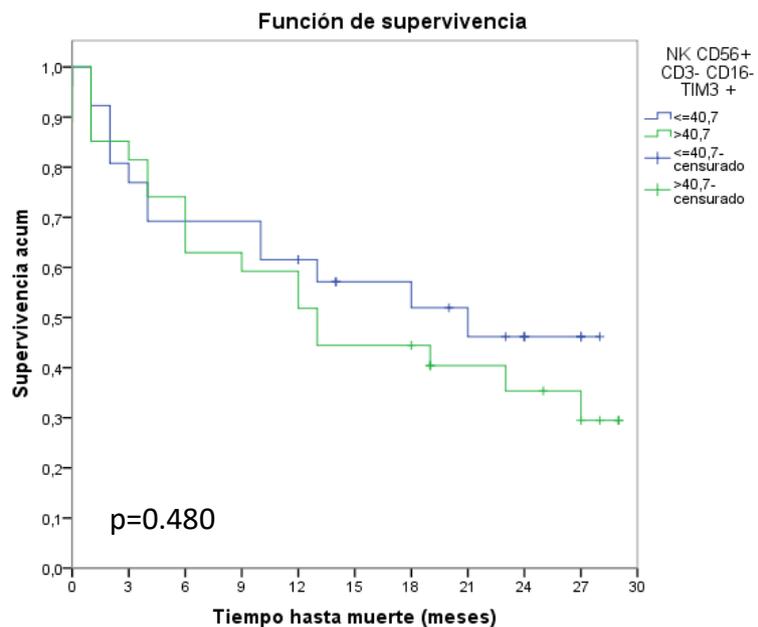
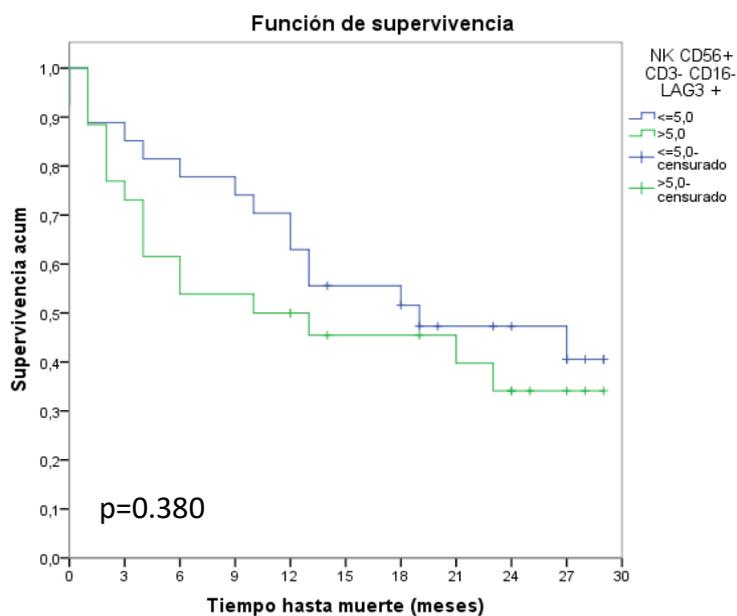
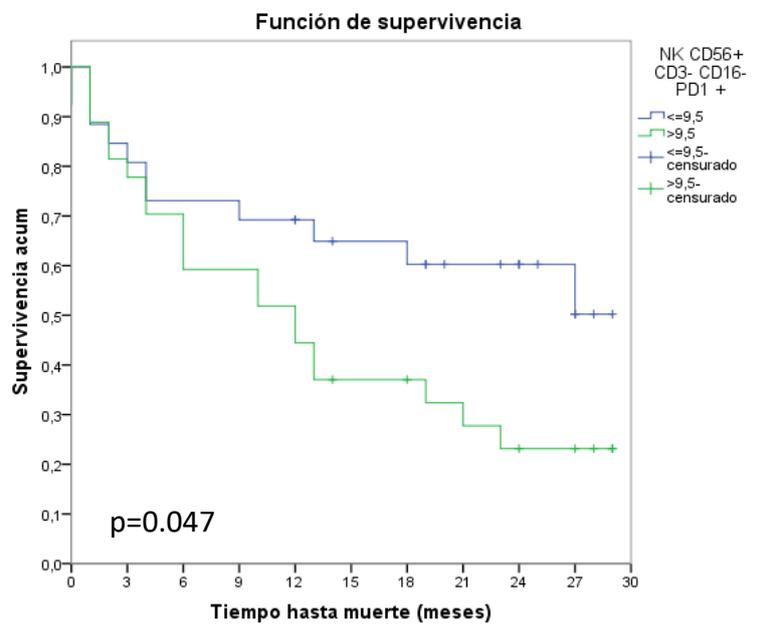
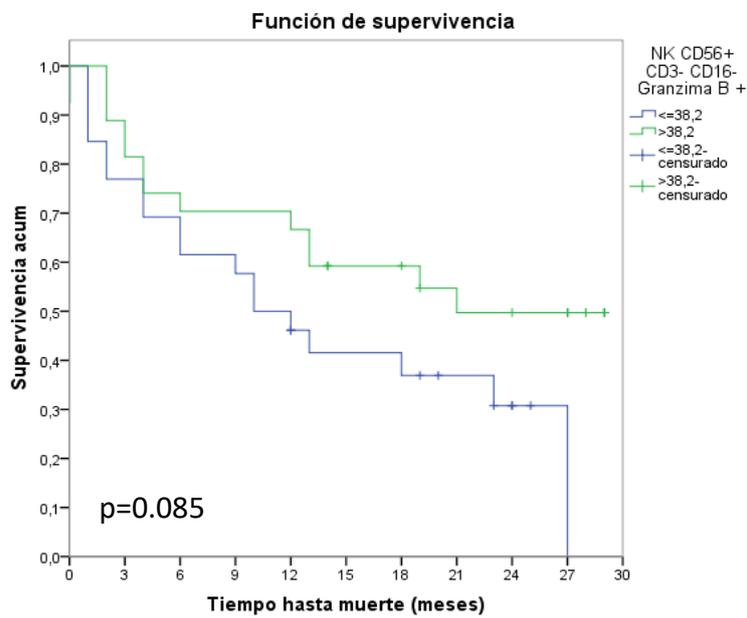
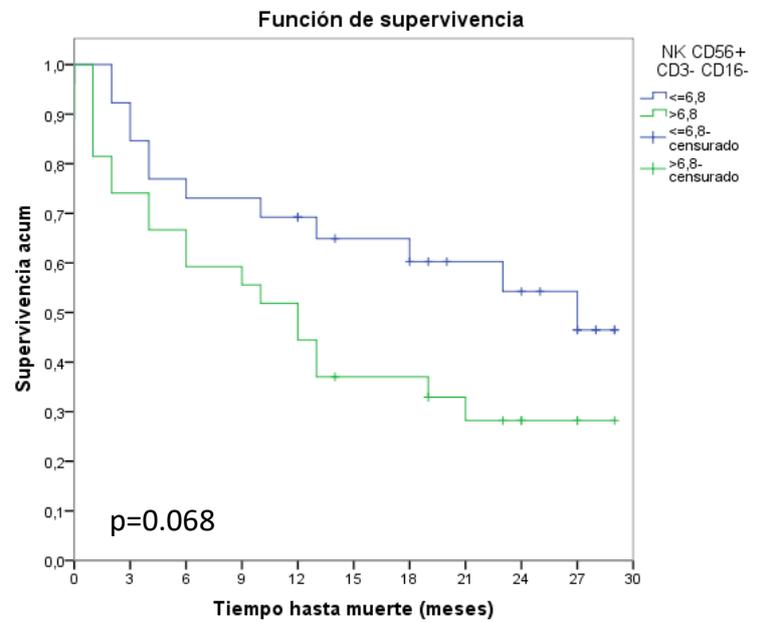
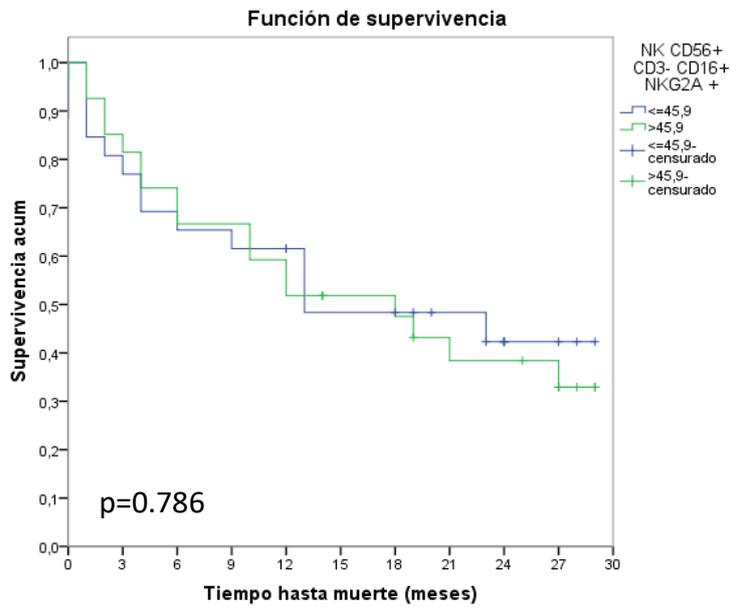


Figura 26: Análisis de SG según la proporción de las diversas poblaciones de células NK analizadas

4.3.4 Otras determinaciones:

Pueden observarse diferencias estadísticamente significativas ($p=0.017$) en función del valor de LDH, siendo la SG menor en aquellos pacientes con un valor de LDH por encima del límite superior de la normalidad (figura 27).

En cuanto a la comparación realizada según la expresión de PD-L1, aunque sí que se observa una tendencia a la diferenciación ($p=0.194$), no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados (figura 28).

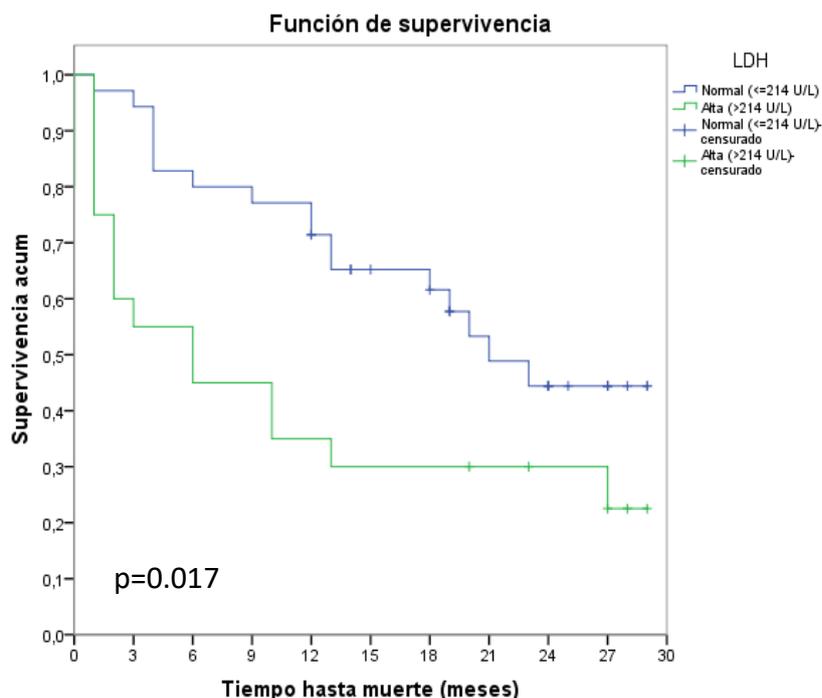


Figura 27: Análisis de SG según el valor de LDH

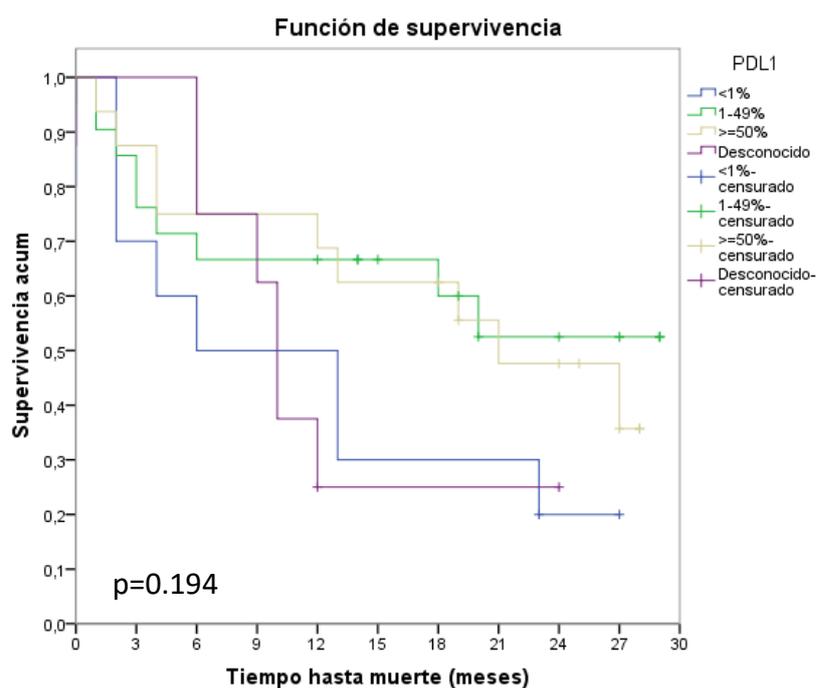


Figura 28: Análisis de SG según la expresión de PDL-1

4.4 Análisis multivariante

Se ha realizado un modelo de regresión de Cox para evaluar el impacto de las diferentes variables en la SG. Las variables que se han seleccionado para ser incluidas en el modelo son aquellas que han resultado significativas en el análisis univariante de supervivencia: ECOG, estadio, indicación de tratamiento, tipo de inmunoterapia, mejor respuesta, LDH y NK CD56⁺ CD3⁻ CD16⁻PD1⁺.

A continuación, se muestran los resultados de la regresión de Cox con cada una de las variables individualmente (Tabla 7)

Covariables	HR	IC (HR) 95%	P valor
ECOG 1	3.247	1.606 – 6.562	0.001
Estadio IV	6.539	1.983 – 21.565	0.002
IT Localmente avanzado	-	-	0.001
IT 1ª línea paliativa	5.063	1.108 – 23.126	0.036
IT 2ª línea y sucesivas	12.84	2.962 – 55.656	0.001
Durvalumab	-	-	0.001
Nivolumab	3.336	0.302 – 36.831	0.325
Pembrolizumab	5.668	1.266 – 25.376	0.023
Atezolizumab	15.635	3.543 – 68.922	<0.001
MR Respuesta completa	-	-	<0.001
MR Respuesta parcial	4.582	0.534 – 39.348	0.165
MR Enfermedad estable	8.384	1.026 – 68.509	0.047
MR Progresión	37.880	4.830 – 297.063	0.001
MR No evaluable	377.216	33.191 – 4287.125	<0.001
LDH alta > 214 U/L	2.262	1.124 – 4.551	0.022
NK CD56 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁻ PD1 ⁺ (> 9.5)	2.052	0.980 – 4.295	0.056

Tabla 7: Coeficientes individuales de las variables incluidas en la regresión de Cox. ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group* | IT: indicación de tratamiento; MR: Mejor respuesta; LDH: lactato deshidrogenasa; NK: Natural Killer; HR: Hazard ratio; IC: intervalo de confianza

Tras la realización del modelo multivariante se han obtenido los siguientes coeficientes de correlación (Tabla 8). Como puede observarse en la tabla, las variables que han mantenido su significación estadística y son un factor predictor de mortalidad son el ECOG 1 respecto al ECOG 0 (riesgo de 2.5 veces) y el estadio IV respecto al estadio III (riesgo de casi 10 veces). Por el contrario, el tratamiento con pembrolizumab (con un riesgo de 0.25 veces) es el único factor protector. El resto de las variables no incluidas en esta tabla no han alcanzado la significación en el modelo multivariante y por tanto no se han tenido en cuenta para este análisis.

Covariables	HR	IC (HR) 95%	P valor
ECOG 1	2.496	1.155 – 5.391	0.020
Estadio IV	9.929	1.193 – 82.625	0.034
Durvalumab	0.454	0.037 – 5.540	0.536
Nivolumab	0.199	0.024 – 1.657	0.135
Pembrolizumab	0.233	0.098 – 0.557	0.001
Atezolizumab	-	-	0.008

Tabla 8: Modelo de Cox multivariante. ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; IT: indicación de tratamiento; MR: Mejor respuesta; LDH: lactato deshidrogenasa; NK: Natural Killer; HR: Hazard ratio; IC: intervalo de confianza

5. DISCUSIÓN

Nuestro trabajo ha analizado de forma prospectiva una cohorte de pacientes con cáncer de pulmón que reciben tratamiento con inmunoterapia intentando determinar biomarcadores celulares en sangre periférica predictivos de respuesta. A este respecto se ha encontrado una diferencia estadística significativa entre una menor proporción de células NK CD56⁺ CD16⁻ PD-1⁺ y una mayor SG.

En cuanto a las características clínicas y demográficas de nuestra muestra, la mediana de edad es de 65 años con un 70.9% de varones. Estos datos se corresponden con la distribución normal de esta enfermedad(1,3). En cuanto al consumo de tabaco, es por todos conocido que promueve el desarrollo de un cáncer de pulmón, sin embargo, el porcentaje tan alto observado en nuestra muestra (96.4%), probablemente sea debido a que los pacientes no fumadores tienen más posibilidades de tener alguna mutación o *driver* que permita tener un tratamiento dirigido más específico, no siendo candidatos a inmunoterapia, y por ello no incluidos en nuestro estudio.

En cuanto al ECOG, el 65.5% de los pacientes se encontraban en un ECOG 0 y un 34.5% en ECOG 1, sin existir ningún paciente con ECOG 2 o superior por ser este un criterio de exclusión para recibir inmunoterapia. Al comparar ambos grupos, se observan diferencias estadísticamente significativas (ECOG 0 y 1 $p < 0.0001$) tal y como ya había sido descrito en otras series previas, convirtiéndose esta escala clínica en un marcador pronóstico del tratamiento con inmunoterapia(141,142).

En lo relativo a la histología, la distribución es acorde a lo que observamos en la práctica clínica, siendo la estirpe adenocarcinoma más frecuente que la escamosa (60% vs 40%)(3). En cuanto al estadio tumoral, la mayor parte de los pacientes se encontraban en un estadio IV (32.7% en primera línea, 41.8% en segunda o sucesivas), siendo este grupo el que tiene una SG peor con una diferencia estadísticamente significativa tal y como se espera al tratarse de un estadio más avanzado.

En relación con los fármacos inmunoterápicos usados, la mayor parte se distribuyen entre atezolizumab (32.7%) y pembrolizumab (38.2%), con un 25.5% tratados con durvalumab y únicamente un 3.6% con nivolumab. Atendiendo a esta distribución, las diferencias estadísticamente significativas se han encontrado entre atezolizumab, pembrolizumab y durvalumab. Dichas diferencias, parecen más relacionadas con la indicación clínica de dichos fármacos que por una mayor eficacia de cada uno de ellos, ya que se observa que durvalumab (tratamiento administrado como consolidación de los estadios III) se relaciona con mayor SG que pembrolizumab (indicación sobre todo en primera línea) y atezolizumab (con un uso mayor en líneas sucesivas en la práctica clínica). Además, el número de pacientes es pequeño para sacar conclusiones a este respecto y el estudio no ha sido diseñado para tal fin.

En cuanto a las respuestas observadas, nuestra muestra tiene una TR de 63.6% ,un 27.3% de progresiones, una SLP de 10 meses y una SG de 19 meses. Todos estos datos se corresponden con los detallados previamente de los ensayos clínicos realizados con los fármacos inmunoterápicos(31-37,39,41,143).

Todos estos datos, aunque no aumentan nuestro conocimiento en este tema, son muy útiles para confirmar una selección adecuada de nuestra cohorte lo que avala su calidad y la validan para hacer las nuevas determinaciones experimentales.

Con respecto a las células T, se ha observado en la literatura que los pacientes con una buena respuesta a la inmunoterapia tienden a tener un número reducido de células basales en sangre periférica, con una expansión de esta población al inicio del tratamiento, en comparación con los no respondedores. Estos resultados previamente descritos en melanoma (144), acaban de confirmarse también en una cohorte de pacientes con CPNM, observándose que aquellos pacientes con niveles bajos de linfocitos T CD8⁺ PD-1⁺ en sangre periférica al inicio del tratamiento con inmunoterapia, eran aquellos con las respuestas más duraderas al tratamiento (119,120).

Complementando este estudio, Kamphorst y colaboradores observaron que una expansión temprana de las células T PD-1⁺ CD8⁺ periféricas durante el tratamiento con anti PD-1 en el CPNM tuvo un efecto positivo en la respuesta al tratamiento. Mientras que el 70% de los pacientes con progresión de la enfermedad tuvieron una respuesta de células T PD-1⁺ CD8⁺ retrasada o ausente, el 80% de los pacientes con beneficio clínico mostraron respuestas de células T PD-1⁺ CD8⁺ dentro de las 4 semanas posteriores al inicio del tratamiento (121). Este resultado fue también confirmado por Mazzaschi y sus colaboradores en pacientes con CPNM tratados con nivolumab(122) y en otro estudio de pacientes con CPNM en tratamiento con pembrolizumab o nivolumab(123). Recientemente, otro estudio de pacientes con CPNM en tratamiento con atezolizumab también observó un aumento en la concentración de linfocitos T CD8⁺ activados por neoantígeno durante el tratamiento, en pacientes que experimentaban respuesta al mismo (124).

En el caso de nuestro estudio, hemos intentado seleccionar mejor las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ en función de la expresión de PD-1, TIM3 y LAG3. En este sentido, a pesar de lo detallado en la bibliografía (54,56,119,120) que relaciona la alta expresión de PD-1 en los linfocitos TCD8⁺ con una mejor respuesta al tratamiento con inmunoterapia, no hemos obtenido estos resultados en nuestra muestra ($p=0.669$) al relacionar su expresión con la SG. Lo mismo ocurre con la expresión de TIM3 ($p=0.730$) y LAG3 ($p=0.153$). Sin embargo, en esta última, aunque el tamaño muestral no permite obtener un resultado estadísticamente significativo, sí se observa una clara tendencia a la diferenciación con una peor SG en aquellos pacientes con una elevada proporción de linfocitos TCD8⁺ LAG3⁺, tal y como ya se describía en el estudio de Datar et al. (60). Es importante incidir en que estas poblaciones de linfocitos TCD8⁺ con expresión elevada de puntos de control inmune incluyen tanto linfocitos T activados como linfocitos T exhaustos. Esta heterogeneidad puede influir en su poder como marcador pronóstico y por este motivo, en nuestro estudio hemos medido la expresión de GzmB para diferenciar la población de linfocitos activados (GzmB⁺) y exhaustos (GzmB⁻).

En cuanto a la expresión de GzmB⁺ por los linfocitos T CD8⁺, a pesar de que ello les diferencia como una población de linfocitos activados, no hemos observado ninguna diferencia en la SG en relación con la alta o baja proporción de estos linfocitos en sangre

periférica antes del inicio de tratamiento con inhibidores de puntos de control inmune (ICI).

En relación a los linfocitos T CD4⁺, no existe, por el momento, tanta evidencia en la bibliografía y los últimos estudios están evaluando la contribución específica de la inmunidad de esta subpoblación a la eficacia de la inmunoterapia, dado que aún se desconoce su función.

En los linfocitos T CD4⁺ con actividad cooperadora, se ha observado, al igual que con los T CD8⁺, que una expansión temprana en sangre periférica durante el tratamiento con inmunoterapia se relaciona con un mejor pronóstico en modelos de ratones con melanoma (145). Por el contrario, un estudio clínico en pacientes con CPNM reveló que la acumulación de linfocitos T CD4⁺ FOXP3⁻ PD-1^{high} dentro del tumor y la sangre periférica se correlacionó con una mayor carga tumoral. Además, la disminución de dicha población durante el inicio de la terapia se asoció significativamente con una mejora de la SG lo que sugiere que esas células podrían estar en fase latente o agotadas (125).

Recientemente se ha publicado un estudio con pacientes con CPNM en tratamiento con anti-PD-1, en el que se ha observado que aquellos que respondían al tratamiento, tenían porcentajes significativamente más altos de células T CD4⁺ efectoras (CD62low) antes del inicio del tratamiento ($p < 0,0001$). Por el contrario, el porcentaje de linfocitos Treg (CD25⁺ FOXP3⁺ CD4⁺) fue significativamente mayor en los que no respondieron ($p = 0.034$) (126). Este estudio tiene el tamaño de muestra más grande de los disponibles en la literatura ($n = 143$). Sin embargo, se trata de pacientes tratados exclusivamente con nivolumab y no especifican estadio tumoral. Además, evalúan la respuesta al tratamiento con inmunoterapia, pero no la SG, por lo que los resultados pueden ser diferentes a los obtenidos en nuestro estudio. Estos datos se han confirmado en otra cohorte de pacientes con CPNM en tratamiento con inmunoterapia observándose una mayor SLP y mayor respuesta en aquellos pacientes con T CD4⁺ elevados junto con Treg bajos a nivel basal (127). El tamaño muestral de este estudio es menor ($n = 34$), y su diseño es retrospectivo. Por otro lado, sí incluye cualquier tipo de inmunoterapia, aunque las poblaciones celulares evaluadas son menos específicas que en nuestro estudio. También existen datos *post hoc* de un ensayo clínico en pacientes con CPNM en tratamiento con inmunoterapia de manera neoadyuvante, encontrándose una relación entre la mayor concentración de linfocitos T CD4⁺ PD-1⁺ a nivel basal y una mayor respuesta al tratamiento (128). En este análisis *post hoc*, se incluyó una muestra pequeña (29 pacientes). Como ensayo clínico, es probable que los pacientes incluidos sean menos representativos de la práctica clínica que los nuestros. Además, la variable de resultado evaluada es la respuesta a la inmunoterapia, no la SG. Finalmente, a diferencia de nuestro trabajo, este análisis *post hoc* incluyó pacientes con estadio III resecable, y la inmunoterapia siempre se administró en combinación con quimioterapia.

En relación con los datos de nuestro estudio en lo relativo a los linfocitos T CD4⁺, a pesar de no existir capacidad estadística suficiente como para obtener un resultado estadísticamente significativo, sí observamos una tendencia que detallaremos a continuación. A nivel de los linfocitos TCD4 reguladores, se observa una tendencia

($p=0.163$) a una mejor SG en aquellos pacientes con una baja proporción de estas células en sangre periférica al inicio del tratamiento, siendo estos datos comparables a los obtenidos en otros estudios similares y coherentes con la función antiinflamatoria de estas células inmunes(126,127) . A pesar de las diferencias entre los diferentes estudios descritos anteriormente, las células $CD4^+$ Treg parecen asociarse, en todos los casos con mejores resultados, ya sea en términos de TR o en SG.

La expresión de GzmB por los linfocitos Treg no es frecuente y parece que esta expresión selecciona a una población de linfocitos Treg que inhiben la inmunidad celular mediante mecanismos citotóxicos contra los linfocitos T $CD8^+$ y no con secreción de citoquinas anti-inflamatorias (146). Analizando estas dos poblaciones celulares ($GzmB^+$ o $GzmB^-$), vemos también una tendencia ($p=0.091$ y 0.192 respectivamente), a una mejor SG en aquellos pacientes con una baja proporción de Treg $CD4^+GzmB^+$ y una alta proporción de Treg $CD4^+GzmB^-$, apoyando el papel de este subconjunto Treg en la prevención de respuestas de células antitumorales.

Centrándonos en los linfocitos T de memoria, un estudio publicado recientemente ha demostrado que el estado previo al tratamiento de la inmunidad $CD4$ sistémica es un factor crítico para determinar el resultado clínico de la terapia de bloqueo de PD-L1 / PD-1 en pacientes con CPNM. En particular, mostraron que solo los pacientes con un alto número previo al tratamiento de células T $CD4$ de memoria central y efectora con un fenotipo altamente diferenciado ($CD27^- CD28^{low/-}$) respondieron al tratamiento. Estas células T $CD4^+$ exhibieron capacidades proliferativas significativas y baja coexpresión de PD-1 o LAG-3 al inicio del estudio, y respondieron al bloqueo de PD-1 ex vivo e in vivo. En contraste, los pacientes con un bajo número de células T $CD4^+$ de memoria exhibieron una disfuncionalidad reflejada como una capacidad de proliferación muy deteriorada y una alta coexpresión de LAG-3 y PD-1 asociada a la resistencia al bloqueo de PD-L1 / PD-1 ex vivo e in vivo (129).

Esto también se confirmó en el estudio de Kagamu et al, donde identificaron una población de linfocitos T memoria efectora ($CD4^+ CD62^{low}$) que estaba presente en números más altos en los pacientes que respondían al inicio del tratamiento con anti PD-1. A su vez, los pacientes que mantuvieron un alto número de estos linfocitos T de memoria sobrevivieron durante mucho más tiempo, mientras que la disminución de los niveles después del inicio del tratamiento se correlacionaba con una resistencia al mismo (126).

En nuestro estudio, no se observan diferencias en relación con los linfocitos T de memoria (tanto $CD8^+$ como $CD4^+$) a pesar de que estudios como Zuazo et al y Kargamu et al (126,129) catalogaban a esta población como un posible biomarcador de respuesta al tratamiento con inmunoterapia. Sin embargo, nuestros datos confirman los obtenidos en el estudio de Ribas et al, donde observaron que el aumento de los linfocitos T memoria en TILs se relacionaba con una mejor respuesta al tratamiento en pacientes con melanoma tratados con inmunoterapia, pero este aumento no se observaba en las muestras de sangre periférica (147).

Tal y como se ha mencionado anteriormente para el subconjunto de células TME, también en sangre periférica se ha encontrado que la relación entre los linfocitos circulantes sería una forma más específica de predecir la respuesta a la inmunoterapia.

Teniendo en cuenta la relación CD8⁺/CD4⁺, se ha demostrado que una relación basal alta de CD8⁺/CD4⁺ en sangre periférica se correlaciona de forma estadísticamente significativa con un mejor pronóstico en el CPNM en estadios precoces (HR 0,19) (134). Sin embargo, existen otros datos contradictorios en la bibliografía (148), concretamente un estudio reciente ha relacionado un mayor ratio CD4⁺/CD8⁺ con una mayor respuesta y mayor SLP en pacientes con CPNM tratados con inmunoterapia (127).

En los datos obtenidos de nuestro estudio, el ratio de linfocitos TCD8⁺ / T CD4⁺, no obtiene diferencias estadísticamente significativas, a pesar de lo encontrado previamente en la bibliografía. (134,142,148)

En cuanto a las poblaciones de células NK, algunos estudios han analizado la relación entre células NK circulantes y su fenotipo, con el pronóstico y la respuesta a la inmunoterapia, con algunos resultados sorprendentes e inesperados que requerirán una mayor aclaración y confirmación (132).

Las células NK circulantes se clasifican principalmente, como hemos detallado previamente, en base al nivel de expresión de CD56 y CD16. Las células CD56^{dim}CD16⁺, son células NK maduras con una función citotóxica y las CD56^{bright}CD16^{low/-}, una función inmunorreguladora(149). Mazzaschi y colaboradores estudiaron la relación entre las células NK y la respuesta al tratamiento, y observaron que al inicio del tratamiento con inmunoterapia en los pacientes con CPNM, las células CD56⁺ NK resultaban 2 veces más altas en el grupo que respondía al tratamiento en comparación con el que no respondía (122).

Curiosamente, en otro estudio mencionado anteriormente (120) se encontraban resultados opuestos en pacientes tratados con nivolumab, siendo el recuento bajo de células NK en sangre al inicio un biomarcador predictivo de respuesta. Sin embargo, debe de tenerse en cuenta que los autores no diferenciaron entre los subconjuntos de células NK CD56^{bright} no citotóxicas y CD56^{dim} citotóxicas y, por lo tanto, los resultados no son concluyentes con respecto a las células NK. De hecho, se encontró previamente que en pacientes con melanoma (150), las células NK CD56^{bright} circulantes se correlacionan inversamente con la supervivencia de los pacientes y que el tejido de los pacientes con CPNM suele estar infiltrado por células NK no citotóxicas CD56^{bright} en mayor proporción que las citotóxicas (CD56^{dim}CD16⁺) (151).

En lo referente a los datos de las células NK a nivel global, en nuestro estudio, no existen diferencias (p=0.512), a pesar de los datos de los estudios previamente detallados (120,122).

Si separamos la población de células NK entre citotóxicas (CD56^{dim}CD16⁺) y no citotóxicas (CD56^{bright}CD16⁻) sí que observamos diferencias, aunque sin conseguir la significación estadística. Una mayor proporción de células NK CD56⁺ CD16⁺ se relacionan

con una mayor SG ($p=0.082$), al contrario que una baja proporción de células NK CD56⁺, CD16⁻ ($p=0.068$), tal y como ya se observó en los estudios de DeJonge y Carrega et al (150,151) .

Analizando la expresión de diferentes marcadores dentro de la población de células NK CD56⁺ CD16⁺, con el fin de encontrar poblaciones con funciones más específicas, no se han observado diferencias entre la mayor expresión de LAG3 y PD-1 ($p=0.972$ y 0.584 respectivamente). Sin embargo, con la expresión TIM3, sin llegar a la significación estadística, sí se observa una tendencia ($p=0.153$) a una mayor SG en pacientes con baja expresión de TIM3 en este subtipo celular. Esto podría explicarse porque la expresión de TIM3, al igual que ocurre con LAG3, confiere a la célula NK un perfil funcional distinto que se asocia con una SLP más corta tal y como demuestra el estudio de Datar et al (60).

A pesar de no alcanzar la significación estadística, también se observa una clara diferenciación entre aquellos pacientes NK CD56⁺ CD16⁺ según la expresión de GzmB⁺. Existe una mejor SG en aquellos pacientes con una alta proporción de células NK CD56⁺ CD16⁺GzmB⁺ ($p=0.15$). Como ya se ha comentado previamente, la expresión de GzmB, se correlaciona con la activación celular, confiriendo a la célula inmune mayores capacidades citotóxicas (21). A su vez, se observa una tendencia a la diferenciación en la población NK CD56⁺ CD16⁺GzmB⁻ PD-1⁺ ($p: 0.126$) con una mejor SG para aquellos pacientes con una baja proporción de esta estirpe celular exhausta.

En cuanto al resto de receptores analizados en la población de células NK CD56⁺ CD16⁺, no se han observado diferencias entre la distinta expresión de NKp46, NKG2D ni NKG2A ($p=0.647$, 0.537 y 0.786 respectivamente), a pesar de que a nivel de células NK NKp46⁺ CD56^{dim} circulantes hay algún estudio que correlacionó su concentración en sangre periférica inversamente con el pronóstico en CPNM, sin analizar su respuesta a la inmunoterapia (152).

Donde sí puede observarse una tendencia, aunque no significativa, en nuestro estudio es en la expresión de CD57, con una mejor SG para aquellos pacientes con una baja proporción de células NK CD56⁺ CD16⁺ CD57⁺ ($p=0.103$) . Aunque estudios recientes posicionan a este subtipo celular como una población de células NK muy diferenciada y con capacidades citotóxicas, la expresión de CD57 puede considerarse como un marcador de diferenciación terminal con la posibilidad de anergia y senescencia celular, que explicaría los resultados obtenidos (153)

Centrándonos ahora en la población de células NK CD56⁺ CD16⁻ se ha analizado la expresión de diferentes marcadores entre los que destacan LAG3, TIM3, PD-1 y GzmB⁺. No existen diferencias en la expresión de TIM3, LAG3 y GzmB⁺, pero sí existe una tendencia hacia la diferenciación en las GzmB⁺ ($p=0.085$) con una mayor SG en aquellos pacientes con una alta proporción de células NK CD56⁺ CD16⁻ GzmB⁺. Las células NK CD56⁺ CD16⁻ son células con actividad reguladora pudiendo tanto activar como inhibir al resto de poblaciones inmunitarias. La población de células NK CD56⁺ CD16⁻ GzmB⁺ no existe en personas sanas y en aquellas personas que, por patologías de base, aparecen, suele ser un grupo celular muy reducido y sin que tengamos, por el momento, clara su función exacta. Parece ser que se encargan de la regulación de la inmunidad

inhibiéndola o incluso activándola, mediante mecanismos citotóxicos y de secreción de citoquinas proinflamatorias, cuando se encuentran con algún estímulo específico. Esta actividad citotóxica, podrían justificar nuestros resultados de que una alta proporción de estas células NK CD56⁺ CD16⁻ GzmB⁺ se relacionan con una mejor SG ($p=0.085$).

En cuanto a la expresión de PD-1 existe una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.047$) entre una menor proporción de células NK CD56⁺ CD16⁻ PD-1⁺ y una mayor SG. Una posible explicación de este hallazgo es que la alta expresión de PD-1⁺ favorece que sea una población que se vaya a activar en gran medida tras el tratamiento con inmunoterapia. Una vez activada, va a secretar citoquinas antiinflamatorias que a su vez inhibirán a otras poblaciones celulares con capacidad citotóxica anti-tumoral.

En relación con la población de células NKT no se han observado diferencias entre ambos grupos. En la literatura, se ha descrito en diferentes estudios, que un nivel bajo de células NKT se relaciona con un peor pronóstico y una mayor carga tumoral, aunque no existe por el momento, evidencia de cómo afecta esta concentración de células NKT, a la respuesta a los tratamientos con inmunoterapia. (107,109-113).

Finalmente, en relación a otras determinaciones que se han llevado a cabo, a pesar de no existir diferencias estadísticamente significativas, sí se ha observado una tendencia ($p=0.194$) a una mayor SG en aquellos pacientes con una alta expresión de PD-L1 en muestra tumoral, tal y como se recoge en muchos estudios realizados hasta la fecha (44-49).

En cuanto a la expresión de LDH pueden observarse diferencias estadísticamente significativas ($p=0.017$), siendo la SG menor en aquellos pacientes con un valor de LDH por encima del límite superior de la normalidad (202 U/L). Estudios previos han demostrado que el nivel inicial de LDH, puede ser un biomarcador relacionado con la carga tumoral, asociándose una mayor concentración de este marcador con una peor evolución y una peor SG en pacientes tratados con inmunoterapia (154-156).

A pesar de la significación alcanzada en algunas de las variables al realizar el análisis univariante, no se ha podido mantener dicha significación al realizar el análisis multivariante. Posiblemente el pequeño tamaño muestral ha podido ser la causa principal.

La principal limitación de nuestro estudio es el pequeño tamaño de la muestra, lo que probablemente nos impidió alcanzar la significación estadística para varias de las poblaciones estudiadas, que sí mostraron una clara tendencia. El pequeño tamaño de la muestra, junto con la variabilidad de algunas de las poblaciones evaluadas, da como resultado desviaciones estándar muy grandes.

Otra limitación es la heterogeneidad de la cohorte, particularmente relacionada con la inclusión de pacientes con estadio III irresecables que reciben radioterapia torácica antes de comenzar la terapia con ICI. Además, hemos considerado solo los resultados de SG para la mayoría de los análisis realizados para definir biomarcadores predictivos para la inmunoterapia.

Por otro lado, una de las fortalezas es la caracterización exhaustiva de las poblaciones de linfocitos y NK, lo que permite un alto grado de detalle en su tipificación funcional.

Aunque el tamaño de la muestra es pequeño, algunas variables clínicas ya conocidas y descritas en la literatura, como el ECOG o el estadio tumoral, alcanzaron significación estadística. Es probable que, aunque sea posible identificar una población de linfocitos con capacidad de predecir la SG de los pacientes, no tenga tanto peso como otras variables clínicas. Además, la dificultad de evaluar la “respuesta” como criterio principal de valoración debido a las características intrínsecas del tratamiento con inmunoterapia dificulta la evaluación de las poblaciones celulares como marcador de respuesta.

Deben realizarse estudios con tamaños de muestra mayores para ver si los resultados iniciales prometedores que hemos encontrado se confirman en cohortes más grandes, lo que ayudaría a optimizar la estrategia de tratamiento con ICI.

6. CONCLUSIONES

- Existen diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con un ECOG 0 con respecto a aquellos con un ECOG 1 ($p < 0.0001$) con una mejor SG en los primeros. Estos datos ya se habían descrito en otras series previas, convirtiéndose esta escala clínica en un marcador pronóstico del tratamiento con inmunoterapia.
- Se observan diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.017$) en función del valor de LDH, siendo la SG menor en aquellos pacientes con un valor de LDH por encima del límite superior de la normalidad (202 U/L).
- No se observan diferencias estadísticamente significativas en función de la proporción de linfocitos T CD8⁺, TCD4⁺, Treg ni linfocitos T memoria.
- No se observan diferencias estadísticamente significativas en las subpoblaciones de linfocitos con expresión de diferentes puntos de control inmune (PD1, TIM3 y LAG3) ni marcadores de activación como GzmB.
- A pesar de no alcanzar la significación estadística, sí se observa una tendencia hacia una mayor SG en los pacientes con una menor proporción de linfocitos T CD8⁺ LAG3 ($p = 0.153$), Treg ($p = 0.163$) y Treg GzmB⁺ ($p = 0.091$). A su vez, se observa una tendencia hacia una mayor SG en los pacientes con una mayor proporción de Treg GzmB⁻ ($p = 0.192$).
- Los pacientes con una menor proporción de células NK CD56^{bright} (CD16⁻) PD-1⁺ presentan mayor SG ($p = 0.047$).

- No se observan diferencias estadísticamente significativas en función de la proporción de células NK ni células NKT.
- No se observan diferencias estadísticamente significativas entre las diversas subpoblaciones de células NK CD56^{dim} (CD16⁺) con expresión de diferentes puntos de control inmune (PD-1, TIM3 y LAG3) ni marcadores de activación o inhibición (GzmB, CD57, NKG2D, NKp46 o NKG2A). Tampoco entre las diversas subpoblaciones de células NK CD56^{bright} (CD16⁻) con expresión de diferentes puntos de control inmune (TIM3 y LAG3) ni GzmB⁺.
- A pesar de no alcanzar la significación estadística, sí se observa una tendencia hacia una mayor SG en los pacientes con una menor proporción de células NK^{dim} TIM3 (p=0.153), NK^{dim} GzmB⁻ PD-1⁺ (p=0.126), NK^{dim} CD57⁺ (p=0.103) y NK^{bright} (p=0.068). A su vez, se observa una tendencia hacia una mayor SG en los pacientes con una mayor proporción de células NK^{dim} (p=0.082), NK^{dim} GzmB⁺ (p=0.150) y NK^{bright} GzmB⁺ (p=0.085).
- La exhaustiva caracterización de las poblaciones de linfocitos y NK, ha permitido un alto grado de detalle en su tipificación funcional. Aunque el tamaño de la muestra es pequeño, algunas variables clínicas ya conocidas y descritas en la literatura, como el ECOG o el estadio tumoral, alcanzaron significación estadística por lo que es probable que, aunque sea posible identificar una población de linfocitos con capacidad de predecir la SG de los pacientes, no tenga tanto peso como otras variables clínicas.
- Deben realizarse estudios con tamaños de muestra mayores para ver si los resultados iniciales prometedores que hemos encontrado se confirman en cohortes más grandes, lo que ayudaría a optimizar la estrategia de tratamiento con ICI.

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021 May 01;71(3):209-249.
- (2) Torres-Durán M, Fernández-Villar A, Ruano-Raviña A. Lung Cancer Unrelated to Smoking. *Arch Bronconeumol (Engl Ed)* 2018 June 01;54(6):301-302.
- (3) Thai AA, Solomon BJ, Sequist LV, Gainor JF, Heist RS. Lung cancer. *Lancet* 2021 August 07;398(10299):535-554.
- (4) Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 2007 January 01;75(1):56-63.
- (5) Asamura H, Chansky K, Crowley J, Goldstraw P, Rusch VW, Vansteenkiste JF, et al. The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the N Descriptors in the Forthcoming 8th Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2015 December 01;10(12):1675-1684.
- (6) National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Non-Small Cell Lung Cancer. Version 6.2021. Available at: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl.pdf. Accessed 10/05, 2021.
- (7) Altorki et al. Sub-Lobar Surgery for Peripheral Non-Small Cell Lung Cancer Non-Inferior to Lobectomy. *WCLC* 2022 .
- (8) Majem M, Juan O, Insa A, Reguart N, Trigo JM, Carcereny E, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018). *Clin Transl Oncol* 2019 January 01;21(1):3-17.
- (9) Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2017 July 01;28(suppl_4):iv1-iv21.
- (10) Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J, et al. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2004 January 22;350(4):351-360.
- (11) Winton T, Livingston R, Johnson D, Rigas J, Johnston M, Butts C, et al. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005 June 23;352(25):2589-2597.
- (12) Douillard JY, Rosell R, De Lena M, Carpagnano F, Ramlau R, González-Larriba JL, et al. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely

resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2006 September 01;7(9):719-727.

(13) Mariano Provencio-Pulla EN. Nivolumab + chemotherapy versus chemotherapy as neoadjuvant treatment for resectable stage IIIa NSCLC: Primary endpoint results of pathological complete response (pCR) from phase II NADIM II trial. *Journal of Clinical Oncology* 2022 40:16_suppl, 8501-8501 .

(14) D. Planchard SP. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up *Ann Oncol* (2020) 29(Suppl 4): iv192–iv237 .

(15) Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2018 October 01;29(Suppl 4):iv192-iv237.

(16) Friedrich MJ. Immunotherapy 2.0: Improving the Response to Checkpoint Inhibitors. *JAMA - Journal of the American Medical Association* 2019;321(2):131-133.

(17) Luis Martinez-Lostao. Visión panorámica de la respuesta inmune. In: Antonio Antón, editor. *Inmunología Tumoral e Inmunoterapia del cáncer Zaragoza (España)*: Amazing books; 2018. p. 127.

(18) Martinez-Lostao L. Visión panorámica de la respuesta inmune. *Inmunología tumoral e inmunoterapia del cáncer*: Amazing books; 2018. p. 121-137.

(19) Martínez-Lostao L, Anel A, Pardo J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clin Cancer Res* 2015 November 15;21(22):5047-5056.

(20) Arias M, Martínez-Lostao L, Santiago L, Ferrandez A, Granville DJ, Pardo J. The Untold Story of Granzymes in Oncoimmunology: Novel Opportunities with Old Acquaintances. *Trends Cancer* 2017 June 01;3(6):407-422.

(21) Pardo J. Mecanismos de citotoxicidad del sistema inmunitario. *Inmunología tumoral e inmunoterapia del cáncer*: Amazingbooks; 2018. p. 105-120.

(22) de Miguel D, Ramirez-Labrada A, Uranga I, Hidalgo S, Santiago L, Galvez EM, et al. Inflammatory cell death induced by cytotoxic lymphocytes: a dangerous but necessary liaison. *FEBS J* 2021 June 26.

(23) Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med* 2009 December 21;206(13):3015-3029.

(24) Terme M, Ullrich E, Aymeric L, Meinhardt K, Desbois M, Delahaye N, et al. IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer. *Cancer Res* 2011 August 15;71(16):5393-5399.

- (25) Bianco A, Malapelle U, Rocco D, Perrotta F, Mazzeola G. Targeting immune checkpoints in non small cell lung cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2018 June 01;40:46-50.
- (26) Paz E, Allende L. Homeostasis del sistema inmune. *Inmunología tumoral e inmunoterapia del cáncer: Amazingbooks*; 2018. p. 139-156.
- (27) Du W, Yang M, Turner A, Xu C, Ferris RL, Huang J, et al. TIM-3 as a Target for Cancer Immunotherapy and Mechanisms of Action. *Int J Mol Sci* 2017 March 16;18(3):645. doi: 10.3390/ijms18030645.
- (28) Felip E, Altorki N, Zhou C, Csósz T, Vynnychenko I, Goloborodko O, et al. Adjuvant atezolizumab after adjuvant chemotherapy in resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2021 October 09;398(10308):1344-1357.
- (29) Paz-Ares M, E R O'Brien M, Mauer U, Dafni K, Oselin L, Havel E, Esteban Gonzalez et al. Pembrolizumab (pembro) versus placebo for early-stage non-small cell lung cancer (NSCLC) following complete resection and adjuvant chemotherapy (chemo) when indicated: Randomized, triple-blind, phase III EORTC-1416-LCG/ETOP 8-15 – PEARLS/KEYNOTE-091 study . ESMO VIRTUAL PLENARY ABSTRACT| VOLUME 33, ISSUE 4, P451 ESMO VIRTUAL PLENARY ABSTRACT| VOLUME 33, ISSUE 4, P451.
- (30) Forde PM, Spicer J, Lu S, Provencio M, Mitsudomi T, Awad MM, et al. Neoadjuvant Nivolumab plus Chemotherapy in Resectable Lung Cancer. *N Engl J Med* 2022 April 11.
- (31) Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csósz T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2016 November 10;375(19):1823-1833.
- (32) Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, De Angelis F, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2018 May 31;378(22):2078-2092.
- (33) Paz-Ares L, Luft A, Vicente D, Tafreshi A, Gümüş M, Mazières J, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2018 November 22;379(21):2040-2051.
- (34) Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han JY, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* 2016 April 09;387(10027):1540-1550.
- (35) Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015 July 09;373(2):123-135.

- (36) Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015 October 22;373(17):1627-1639.
- (37) Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2017 November 16;377(20):1919-1929.
- (38) David R. Spigel CF. Five-year survival outcomes with durvalumab after chemoradiotherapy in unresectable stage III NSCLC: An update from the PACIFIC trial. *2022 J Clin oncol.*
- (39) Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, Stroyakovskiy D, Nogami N, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. *N Engl J Med* 2018 June 14;378(24):2288-2301.
- (40) Herbst RS, Giaccone G, de Marinis F, Reinmuth N, Vergnenegre A, Barrios CH, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1-Selected Patients with NSCLC. *N Engl J Med* 2020 October 01;383(14):1328-1339.
- (41) Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2017 January 21;389(10066):255-265.
- (42) Paz-Ares L, Ciuleanu TE, Cobo M, Schenker M, Zurawski B, Menezes J, et al. First-line nivolumab plus ipilimumab combined with two cycles of chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer (CheckMate 9LA): an international, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2021 February 01;22(2):198-211.
- (43) Sezer A, Kilickap S, Gümüş M, Bondarenko I, Özgüroğlu M, Gogishvili M, et al. Cemiplimab monotherapy for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer with PD-L1 of at least 50%: a multicentre, open-label, global, phase 3, randomised, controlled trial. *Lancet* 2021 February 13;397(10274):592-604.
- (44) Pabani A, Butts CA. Current landscape of immunotherapy for the treatment of metastatic non-small-cell lung cancer. *Current Oncology* 2018 June 01;25:S94-S102.
- (45) Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Perez-Gracia JL, Han JY, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* 2016 April 09;387(10027):1540-1550.
- (46) Hui R. Long-term OS for patients with advanced NSCLC enrolled in the KEYNOTE-001 study of pembrolizumab (pembro). *J Clin Oncol* 2016;11(S):241-242.

- (47) Lievens LA, Sterman DH, Cornelissen R, Aerts JG. Checkpoint Blockade in Lung Cancer and Mesothelioma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2017;196(3):274-282.
- (48) Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, Ranger-Moore J, Jansson M, Kulangara K, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *Journal of Thoracic Oncology* 2017 February 01;12(2):208-222.
- (49) Yi M, Jiao D, Xu H, Liu Q, Zhao W, Han X, et al. Biomarkers for predicting efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors. *Mol Cancer* 2018 August 23;17(1):129-018.
- (50) Hegde PS, Chen DS. Top 10 Challenges in Cancer Immunotherapy. *Immunity* 2020 January 14;52(1):17-35.
- (51) Bianco A, Perrotta F, Barra G, Malapelle U, Rocco D, De Palma R. Prognostic Factors and Biomarkers of Responses to Immune Checkpoint Inhibitors in Lung Cancer. *Int J Mol Sci* 2019 October 05;20(19):4931. doi: 10.3390/ijms20194931.
- (52) Hinshaw DC, Shevde LA. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res* 2019 September 15;79(18):4557-4566.
- (53) Martínez-Lostao L. Estructura y organización del sistema inmunitario: inmunidad innata y adaptativa. Componentes celulares y moleculares. *Inmunología tumoral e inmunoterapia del cáncer: AmazingBooks; 2018. p. 15-44.*
- (54) Badalamenti G, Fanale D, Incorvaia L, Barraco N, Listi A, Maragliano R, et al. Role of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with solid tumors: Can a drop dig a stone? *Cell Immunol* 2019 September 01;343:103753.
- (55) Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 2007 December 06;450(7171):903-907.
- (56) Thommen DS, Koelzer VH, Herzig P, Roller A, Trefny M, Dimeloe S, et al. A transcriptionally and functionally distinct pd-1 + cd8 + t cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with pd-1 blockade. *Nat Med* 2018 June 01;24(7).
- (57) Antón A, Anel A, Martínez-Lostao L, Pardo J, Roberto Pazo. Mecanismos de evasión de la inmunidad anti-tumoral. *Inmunología Tumoral e Inmunoterapia del cáncer: Amazing books; 2018. p. 177.*
- (58) Saleh RR, Peinado P, Fuentes-Antrás J, Pérez-Segura P, Pandiella A, Amir E, et al. Prognostic Value of Lymphocyte-Activation Gene 3 (LAG3) in Cancer: A Meta-Analysis. *Front Oncol* 2019 October 15;9:1040.

- (59) Pérez-Ruiz E, Melero I, Kopecka J, Sarmiento-Ribeiro AB, García-Aranda M, De Las Rivas J. Cancer immunotherapy resistance based on immune checkpoints inhibitors: Targets, biomarkers, and remedies. *Drug Resist Updat* 2020 December 01;53:100718.
- (60) Datar I, Sanmamed MF, Wang J, Henick BS, Choi J, Badri T, et al. Expression Analysis and Significance of PD-1, LAG-3, and TIM-3 in Human Non-Small Cell Lung Cancer Using Spatially Resolved and Multiparametric Single-Cell Analysis. *Clin Cancer Res* 2019 August 01;25(15):4663-4673.
- (61) Lee JS, Ruppin E. Multiomics Prediction of Response Rates to Therapies to Inhibit Programmed Cell Death 1 and Programmed Cell Death 1 Ligand 1. *JAMA Oncology* 2019 August 01.
- (62) Althammer S SK. Combinatorial CD8+ and PD-L1+ cell densities correlate with response and improved survival in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with durvalumab. 2016;4(2):91.
- (63) Kowanetz M, Zou W, Gettinger SN, Koeppen H, Kockx M, Schmid P, et al. Differential regulation of PD-L1 expression by immune and tumor cells in NSCLC and the response to treatment with atezolizumab (anti-PD-L1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018 October 23;115(43):E10119-E10126.
- (64) Gros A, Robbins PF, Yao X, Li YF, Turcotte S, Tran E, et al. PD-1 identifies the patient-specific CD8+ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest* 2014;124(5):2246-2259.
- (65) Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol* 2016 December 01;17(12):e542-e551.
- (66) Zuazo M, Arasanz H, Bocanegra A, Fernandez G, Chocarro L, Vera R, et al. Systemic CD4 Immunity as a Key Contributor to PD-L1/PD-1 Blockade Immunotherapy Efficacy. *Front Immunol* 2020 November 30;11:586907.
- (67) Nguyen AH, Berim IG, Agrawal DK. Cellular and molecular immunology of lung cancer: therapeutic implications. *Expert Rev Clin Immunol* 2014 December 01;10(12):1711-1730.
- (68) Escors D, Bocanegra A, Chocarro L, Blanco E, Piñeiro-Hermida S, Garnica M, et al. Systemic CD4 Immunity and PD-L1/PD-1 Blockade Immunotherapy. *Int J Mol Sci* 2022 October 31;23(21):13241. doi: 10.3390/ijms232113241.
- (69) Lee GR. Phenotypic and Functional Properties of Tumor-Infiltrating Regulatory T Cells. *Mediators Inflamm* 2017;2017:5458178.
- (70) Darwin P, Toor SM, Sasidharan Nair V, Elkord E. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Exp Mol Med* 2018 December 13;50(12):165-018.

- (71) Wu SP, Liao RQ, Tu HY, Wang WJ, Dong ZY, Huang SM, et al. Stromal PD-L1-Positive Regulatory T cells and PD-1-Positive CD8-Positive T cells Define the Response of Different Subsets of Non-Small Cell Lung Cancer to PD-1/PD-L1 Blockade Immunotherapy. *J Thorac Oncol* 2018 April 01;13(4):521-532.
- (72) Preston CC, Maurer MJ, Oberg AL, Visscher DW, Kalli KR, Hartmann LC, et al. The ratios of CD8+ T cells to CD4+CD25+ FOXP3+ and FOXP3- T cells correlate with poor clinical outcome in human serous ovarian cancer. *PLoS One* 2013 November 14;8(11):e80063.
- (73) Chen X, Du Y, Lin X, Qian Y, Zhou T, Huang Z. CD4+CD25+ regulatory T cells in tumor immunity. *Int Immunopharmacol* 2016 May 01;34:244-249.
- (74) Tanaka A, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res* 2017 January 01;27(1):109-118.
- (75) Tao H, Mimura Y, Aoe K, Kobayashi S, Yamamoto H, Matsuda E, et al. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer* 2012 January 01;75(1):95-101.
- (76) Gooden MJ, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer* 2011 June 28;105(1):93-103.
- (77) Ouwerkerk W, van den Berg M, van der Niet S, Limpens J, Luiten RM. Biomarkers, measured during therapy, for response of melanoma patients to immune checkpoint inhibitors: a systematic review. *Melanoma Res* 2019 October 01;29(5):453-464.
- (78) Farhood B, Najafi M, Mortezaee K. CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *J Cell Physiol* 2019 June 01;234(6):8509-8521.
- (79) Uryvaev A, Passhak M, Hershkovits D, Sabo E, Bar-Sela G. The role of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) as a predictive biomarker of response to anti-PD1 therapy in patients with metastatic non-small cell lung cancer or metastatic melanoma. *Med Oncol* 2018 January 31;35(3):25-018.
- (80) Ribas A, Shin DS, Zaretsky J, Frederiksen J, Cornish A, Avramis E, et al. PD-1 Blockade Expands Intratumoral Memory T Cells. *Cancer Immunol Res* 2016 March 01;4(3):194-203.
- (81) Enamorado M, Iborra S, Priego E, Cueto FJ, Quintana JA, Martinez-Cano S, et al. Enhanced anti-tumour immunity requires the interplay between resident and circulating memory CD8(+) T cells. *Nat Commun* 2017 July 17;8:16073.
- (82) Mami-Chouaib F, Blanc C, Cognac S, Hans S, Malenica I, Granier C, et al. Resident memory T cells, critical components in tumor immunology. *J Immunother Cancer* 2018 September 04;6(1):87-018.

- (83) Gebhardt T, Wakim LM, Eidsmo L, Reading PC, Heath WR, Carbone FR. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat Immunol* 2009 May 01;10(5):524-530.
- (84) Gebhardt T, Palendira U, Tschärke DC, Bedoui S. Tissue-resident memory T cells in tissue homeostasis, persistent infection, and cancer surveillance. *Immunol Rev* 2018 May 01;283(1):54-76.
- (85) Karin Steinbach, Ilana Vincenti and Doron Merkler. Resident-Memory T Cells in Tissue-Restricted Immune Responses: For Better or Worse? *Front Immunol*. 2018;9:2827.
- (86) Clarke J, Panwar B, Madrigal A, Singh D, Gujar R, Wood O, et al. Single-cell transcriptomic analysis of tissue-resident memory T cells in human lung cancer. *J Exp Med* 2019 September 02;216(9):2128-2149.
- (87) Djenidi F, Adam J, Goubar A, Durgeau A, Meurice G, de Montpreville V, et al. CD8+CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival in lung cancer patients. *J Immunol* 2015 April 01;194(7):3475-3486.
- (88) Pilar M. Lanuza CP. Recalling the Biological Significance of Immune Checkpoints on NK Cells: A Chance to Overcome LAG3, PD1, and CTLA4 Inhibitory Pathways by Adoptive NK Cell Transfer? *Front Immunol*. 2019; 10: 3010 .
- (89) Borrego F. Regulación de la citotoxicidad de las células NK. *Inmunología tumoral e inmunoterapia del cáncer: Amazingbooks*; 2018. p. 193-208.
- (90) Terrén I, Borrego F. Role of NK Cells in Tumor Progression. *Exp Suppl* 2022;113:169-187.
- (91) Perea F, Bernal M, Sanchez-Palencia A, Carretero J, Torres C, Bayarri C, et al. The absence of HLA class I expression in non-small cell lung cancer correlates with the tumor tissue structure and the pattern of T cell infiltration. *Int J Cancer* 2017 February 15;140(4):888-899.
- (92) Jeffrey S Miller and Lewis L Lanier. Natural Killer in Cancer Immunotherapy. *Annual Review of Cancer Biology* 2019;3:77-103.
- (93) Hsu J, Hodgins JJ, Marathe M, Nicolai CJ, Bourgeois-Daigneault MC, Trevino TN, et al. Contribution of NK cells to immunotherapy mediated by PD-1/PD-L1 blockade. *J Clin Invest* 2018 October 01;128(10):4654-4668.
- (94) Malmberg KJ, Carlsten M, Björklund A, Sohlberg E, Bryceson YT, Ljunggren HG. Natural killer cell-mediated immunosurveillance of human cancer. *Semin Immunol* 2017 June 01;31:20-29.

- (95) Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, et al. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1997 June 15;79(12):2320-2328.
- (96) Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, et al. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 2000 February 01;88(3):577-583.
- (97) Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jimenez R, Chillon MJ, Jareno J, et al. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 2002 January 01;35(1):23-28.
- (98) Schleypen JS, Baur N, Kammerer R, Nelson PJ, Rohrmann K, Grone EF, et al. Cytotoxic markers and frequency predict functional capacity of natural killer cells infiltrating renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006 February 01;12(3 Pt 1):718-725.
- (99) McKay K, Moore PC, Smoller BR, Hiatt KM. Association between natural killer cells and regression in melanocytic lesions. *Hum Pathol* 2011 December 01;42(12):1960-1964.
- (100) Pasero C, Gravis G, Granjeaud S, Guerin M, Thomassin-Piana J, Rocchi P, et al. Highly effective NK cells are associated with good prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Oncotarget* 2015 June 10;6(16):14360-14373.
- (101) Tuminello S, Veluswamy R, Lieberman-Cribbin W, Gnjatic S, Petralia F, Wang P, et al. Prognostic value of immune cells in the tumor microenvironment of early-stage lung cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 2019 December 24;10(67):7142-7155.
- (102) Pesce S, Greppi M, Tabellini G, Rampinelli F, Parolini S, Olive D, et al. Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization. *J Allergy Clin Immunol* 2017 January 01;139(1):335-346.e3.
- (103) Pesce S, Greppi M, Grossi F, Del Zotto G, Moretta L, Sivori S, et al. PD/1-PD-Ls Checkpoint: Insight on the Potential Role of NK Cells. *Front Immunol* 2019 June 04;10:1242.
- (104) Leivas A, Valeri A, Córdoba L, García-Ortiz A, Ortiz A, Sánchez-Vega L, et al. NKG2D-CAR-transduced natural killer cells efficiently target multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2021 August 14;11(8):146-021.
- (105) Cho YH, Choi MG, Kim DH, Choi YJ, Kim SY, Sung KJ, et al. Natural Killer Cells as a Potential Biomarker for Predicting Immunotherapy Efficacy in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Target Oncol* 2020 April 01;15(2):241-247.
- (106) Taniguchi M, Harada M, Dashtsoodol N, Kojo S. Discovery of NKT cells and development of NKT cell-targeted anti-tumor immunotherapy. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2015;91(7):292-304.

- (107) Motohashi S, Okamoto Y, Yoshino I, Nakayama T. Anti-tumor immune responses induced by iNKT cell-based immunotherapy for lung cancer and head and neck cancer. *Clin Immunol* 2011 August 01;140(2):167-176.
- (108) Terabe M, Berzofsky JA. Tissue-Specific Roles of NKT Cells in Tumor Immunity. *Front Immunol* 2018 August 15;9:1838.
- (109) Motohashi S, Kobayashi S, Ito T, Magara KK, Mikuni O, Kamada N, et al. Preserved IFN-alpha production of circulating Valpha24 NKT cells in primary lung cancer patients. *Int J Cancer* 2002 November 10;102(2):159-165.
- (110) Tahir SM, Cheng O, Shaulov A, Koezuka Y, Bublely GJ, Wilson SB, et al. Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer. *J Immunol* 2001 October 01;167(7):4046-4050.
- (111) Molling JW, Kölgen W, van der Vliet HJ, Boomsma MF, Kruizenga H, Smorenburg CH, et al. Peripheral blood IFN-gamma-secreting Valpha24+Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in cancer patients independent of tumor type or tumor load. *Int J Cancer* 2005 August 10;116(1):87-93.
- (112) Molling JW, Langius JA, Langendijk JA, Leemans CR, Bontkes HJ, van der Vliet HJ, et al. Low levels of circulating invariant natural killer T cells predict poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2007 March 01;25(7):862-868.
- (113) Gharagozloo M, Rezaei A, Kalantari H, Bahador A, Hassannejad N, Maracy M, et al. Decline in peripheral blood NKG2D+CD3+CD56+ NKT cells in metastatic colorectal cancer patients. *Bratisl Lek Listy* 2018;119(1):6-11.
- (114) Teng MW, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res* 2015 June 01;75(11):2139-2145.
- (115) Galon J, Bruni D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nature reviews. Drug discovery* 2019 March 01;18(3):197-218.
- (116) Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2014 November 27;515(7528):568-571.
- (117) Ji RR, Chasalow SD, Wang L, Hamid O, Schmidt H, Cogswell J, et al. An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. *Cancer Immunol Immunother* 2012 July 01;61(7):1019-1031.
- (118) Lizotte PH, Ivanova EV, Awad MM, Jones RE, Keogh L, Liu H, et al. Multiparametric profiling of non-small-cell lung cancers reveals distinct immunophenotypes. *JCI Insight* 2016 September 08;1(14):e89014.

- (119) Nabet BY, Esfahani MS, Moding EJ, Hamilton EG, Chabon JJ, Rizvi H, et al. Noninvasive Early Identification of Therapeutic Benefit from Immune Checkpoint Inhibition. *Cell* 2020 October 15;183(2):363-376.e13.
- (120) Ottonello S, Genova C, Cossu I, Fontana V, Rijavec E, Rossi G, et al. Association Between Response to Nivolumab Treatment and Peripheral Blood Lymphocyte Subsets in Patients With Non-small Cell Lung Cancer. *Front Immunol* 2020 February 07;11:125.
- (121) Kamphorst AO, Pillai RN, Yang S, Nasti TH, Akondy RS, Wieland A, et al. Proliferation of PD-1+ CD8 T cells in peripheral blood after PD-1-targeted therapy in lung cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017 May 09;114(19):4993-4998.
- (122) Mazzaschi G, Facchinetti F, Missale G, Canetti D, Madeddu D, Zecca A, et al. The circulating pool of functionally competent NK and CD8+ cells predicts the outcome of anti-PD1 treatment in advanced NSCLC. *Lung Cancer* 2019 January 01;127:153-163.
- (123) Kim KH, Cho J, Ku BM, Koh J, Sun JM, Lee SH, et al. The First-week Proliferative Response of Peripheral Blood PD-1(+)/CD8(+) T Cells Predicts the Response to Anti-PD-1 Therapy in Solid Tumors. *Clin Cancer Res* 2019 April 01;25(7):2144-2154.
- (124) Fehlings M, Jhunjhunwala S, Kowanetz M, O'Gorman WE, Hegde PS, Sumatoh H, et al. Late-differentiated effector neoantigen-specific CD8+ T cells are enriched in peripheral blood of non-small cell lung carcinoma patients responding to atezolizumab treatment. *J Immunother Cancer* 2019 September 12;7(1):249-019.
- (125) Zappasodi R, Budhu S, Hellmann MD, Postow MA, Senbabaoglu Y, Manne S, et al. Non-conventional Inhibitory CD4(+)/Foxp3(-)/PD-1(hi) T Cells as a Biomarker of Immune Checkpoint Blockade Activity. *Cancer Cell* 2018 June 11;33(6):1017-1032.e7.
- (126) Kagamu H, Kitano S, Yamaguchi O, Yoshimura K, Horimoto K, Kitazawa M, et al. CD4(+) T-cell Immunity in the Peripheral Blood Correlates with Response to Anti-PD-1 Therapy. *Cancer Immunol Res* 2020 March 01;8(3):334-344.
- (127) Li P, Qin P, Fu X, Zhang G, Yan X, Zhang M, et al. Associations between peripheral blood lymphocyte subsets and clinical outcomes in patients with lung cancer treated with immune checkpoint inhibitor. *Ann Palliat Med* 2021 March 01;10(3):3039-3049.
- (128) Laza-Briviesca R, Cruz-Bermúdez A, Nadal E, Insa A, García-Campelo MDR, Huidobro G, et al. Blood biomarkers associated to complete pathological response on NSCLC patients treated with neoadjuvant chemoimmunotherapy included in NADIM clinical trial. *Clin Transl Med* 2021 July 01;11(7):e491.
- (129) Zuazo M, Arasanz H, Fernández-Hinojal G, García-Granda MJ, Gato M, Bocanegra A, et al. Functional systemic CD4 immunity is required for clinical responses to PD-L1/PD-1 blockade therapy. *EMBO Mol Med* 2019 July 01;11(7):e10293.

- (130) Valpione S, Galvani E, Tweedy J, Mundra PA, Banyard A, Middlehurst P, et al. Immune-awakening revealed by peripheral T cell dynamics after one cycle of immunotherapy. *Nat Cancer* 2020 February 01;1(2):210-221.
- (131) Manjarrez-Orduno N, Menard LC, Kansal S, Fischer P, Kakrecha B, Jiang C, et al. Circulating T Cell Subpopulations Correlate With Immune Responses at the Tumor Site and Clinical Response to PD1 Inhibition in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Immunol* 2018 August 03;9:1613.
- (132) Cho YH, Choi MG, Kim DH, Choi YJ, Kim SY, Sung KJ, et al. Natural Killer Cells as a Potential Biomarker for Predicting Immunotherapy Efficacy in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Target Oncol* 2020 April 01;15(2):241-247.
- (133) Choi MG, Kim YJ, Lee JC, Rho JK, Choi CM. Efficacy of natural killer cell activity as a biomarker for predicting immunotherapy response in non-small cell lung cancer. *Thorax Cancer* 2020 November 01;11(11):3337-3345.
- (134) Rutkowski J, Cyman M, Slebiada T, Bemben K, Rutkowska A, Gruchala M, et al. Evaluation of peripheral blood T lymphocyte surface activation markers and transcription factors in patients with early stage non-small cell lung cancer. *Cell Immunol* 2017 December 01;322:26-33.
- (135) Zer A, Sung MR, Walia P, Khoja L, Maganti M, Labbe C, et al. Correlation of Neutrophil to Lymphocyte Ratio and Absolute Neutrophil Count With Outcomes With PD-1 Axis Inhibitors in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer* 2018 September 01;19(5):426-434.e1.
- (136) Kelderman S, Heemskerk B, van Tinteren H, van den Brom RR, Hospers GA, van den Eertwegh AJ, et al. Lactate dehydrogenase as a selection criterion for ipilimumab treatment in metastatic melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2014 May 01;63(5):449-458.
- (137) Subrahmanyam PB, Dong Z, Gusenleitner D, Giobbie-Hurder A, Severgnini M, Zhou J, et al. Distinct predictive biomarker candidates for response to anti-CTLA-4 and anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2018 March 01;6(1).
- (138) Mariucci S, Rovati B, Manzoni M, Della Porta MG, Comolli G, Delfanti S, et al. Lymphocyte subpopulation and dendritic cell phenotyping during antineoplastic therapy in human solid tumors. *Clin Exp Med* 2011 December 01;11(4):199-210.
- (139) Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* 2017 January 18;541(7637):321-330.
- (140) Wei X, Gu L, Heng W. T lymphocytes related biomarkers for predicting immunotherapy efficacy in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett* 2021 February 01;21(2):89.

- (141) Lobefaro R, Viscardi G, Di Liello R, Massa G, Iacovino ML, Sparano F, et al. Immunotherapy in advanced Non-Small Cell Lung Cancer patients with poor performance status: The role of clinical-pathological variables and inflammatory biomarkers. *Lung Cancer* 2021 February 01;152:165-173.
- (142) Huemer F, Lang D, Westphal T, Gampenrieder SP, Hutarew G, Weiss L, et al. Baseline Absolute Lymphocyte Count and ECOG Performance Score Are Associated with Survival in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Undergoing PD-1/PD-L1 Blockade. *J Clin Med* 2019 July 10;8(7):1014. doi: 10.3390/jcm8071014.
- (143) Gray JE, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Three-Year Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC-Update from PACIFIC. *J Thorac Oncol* 2020 February 01;15(2):288-293.
- (144) Krieg C, Nowicka M, Guglietta S, Schindler S, Hartmann FJ, Weber LM, et al. High-dimensional single-cell analysis predicts response to anti-PD-1 immunotherapy. *Nat Med* 2018 February 01;24(2):144-153.
- (145) Spitzer MH, Carmi Y, Reticker-Flynn NE, Kwek SS, Madhiredy D, Martins MM, et al. Systemic Immunity Is Required for Effective Cancer Immunotherapy. *Cell* 2017 January 26;168(3):487-502.e15.
- (146) Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 2007 October 01;27(4):635-646.
- (147) Ribas A, Shin DS, Zaretsky J, Frederiksen J, Cornish A, Avramis E, et al. PD-1 Blockade Expands Intratumoral Memory T Cells. *Cancer Immunol Res* 2016 March 01;4(3):194-203.
- (148) Saavedra D, García B, Lorenzo-Luaces P, González A, Popa X, Fuentes KP, et al. Biomarkers related to immunosenescence: relationships with therapy and survival in lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2016 January 01;65(1):37-45.
- (149) Poli A, Michel T, Theresine M, Andres E, Hentges F, Zimmer J. CD56^{bright} natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 2009 April 01;126(4):458-465.
- (150) de Jonge K, Ebering A, Nassiri S, Maby-El Hajjami H, Ouertatani-Sakouhi H, Baumgaertner P, et al. Circulating CD56^{bright} NK cells inversely correlate with survival of melanoma patients. *Sci Rep* 2019 March 14;9(1):4487-019.
- (151) Carrega P, Morandi B, Costa R, Frumento G, Forte G, Altavilla G, et al. Natural killer cells infiltrating human nonsmall-cell lung cancer are enriched in CD56^{bright} CD16⁻ cells and display an impaired capability to kill tumor cells. *Cancer* 2008 February 15;112(4):863-875.
- (152) Picard E, Godet Y, Laheurte C, Dosset M, Galaine J, Beziaud L, et al. Circulating NKp46⁺ Natural Killer cells have a potential regulatory property and predict distinct

survival in Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncoimmunology* 2018 October 19;8(2):e1527498.

(153) Nielsen CM, White MJ, Goodier MR, Riley EM. Functional Significance of CD57 Expression on Human NK Cells and Relevance to Disease. *Front Immunol* 2013 December 09;4:422.

(154) Petrelli F, Cabiddu M, Coinu A, Borgonovo K, Ghilardi M, Lonati V, et al. Prognostic role of lactate dehydrogenase in solid tumors: a systematic review and meta-analysis of 76 studies. *Acta Oncol* 2015 July 01;54(7):961-970.

(155) Tanizaki J, Haratani K, Hayashi H, Chiba Y, Nakamura Y, Yonesaka K, et al. Peripheral Blood Biomarkers Associated with Clinical Outcome in Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Nivolumab. *J Thorac Oncol* 2018 January 01;13(1):97-105.

(156) Kazandjian D, Gong Y, Keegan P, Pazdur R, Blumenthal GM. Prognostic Value of the Lung Immune Prognostic Index for Patients Treated for Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol* 2019 October 01;5(10):1481-1485.