

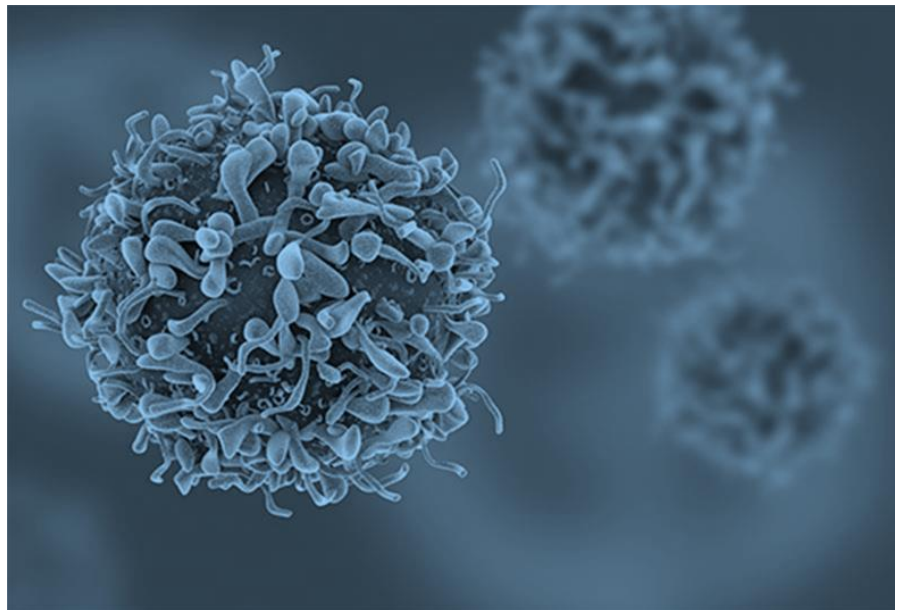


**Universidad  
Francisco de Vitoria**

**Facultad de  
Ciencias  
Experimentales**

# **TRABAJO DE FIN DE GRADO**

**CARACTERIZACIÓN DE BIOMARCADORES  
DE RESPUESTA A INMUNOTERAPIA EN  
SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES DE  
CÁNCER DE PULMÓN AVANZADO**



**Alumna: Cristina Martínez Toledo**

**Tutor UFV: Víctor Sánchez-Arévalo Lobo**

**Tutores IDIPHIM: Alberto Cruz-Bermúdez,  
Mariano Provencio Pulla**

**Junio 2021**

## Índice

Abstract.....	2
Introducción.....	3
Materiales y Métodos .....	11
Resultados .....	14
Discusión:.....	21
Conclusiones:.....	23
Bibliografía .....	24
Anexos .....	28

## Abstract

**Antecedentes:** La inmunoterapia es una opción de tratamiento que está mostrando resultados prometedores en varios tipos de cáncer, entre ellos, el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP). Actualmente, las terapias anti-PD-1/PD-L1 suponen la primera línea de tratamiento para aquellos pacientes con estadios avanzados o metastásicos. Sin embargo, un porcentaje elevado ( $\approx 50\%$ ) no obtiene un beneficio clínico, progresando en pocos meses. Por ello, el desarrollo de biomarcadores es necesario para la identificación previa de aquellos pacientes que van a beneficiarse, lo que permitiría redirigir a los pacientes que no se beneficiarían a otras alternativas terapéuticas.

**Objetivos y Métodos:** El objetivo principal es la búsqueda de nuevos biomarcadores de respuesta a inmunoterapia y de mecanismos de progresión en sangre periférica. Para ello, por medio del estudio de cuatro diferentes paneles de anticuerpos dirigidos a diferentes grupos celulares (linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos T *exhausted* y células mieloides), comparamos las diferencias de estas poblaciones celulares en las muestras de 31 pacientes con CPCNP en estadio IV con progresión de la enfermedad *versus* 31 pacientes sin progresión tras 1 año de tratamiento con anti-PD1/PD-L1.

**Resultados:** No se encontraron asociaciones entre las variables clínicas analizadas y la progresión. En el aspecto molecular, los análisis de las muestras basales mostraron, para los pacientes con progresión, unos niveles elevados de células supresoras derivadas de mieloides de tipo monocítico (Mo-MDSCs) ( $p$ -valor = 0,042), y de linfocitos T CD8+ PD1- con positividad para LAG3 ( $p$  = 0,039), las cuales se han asociado en otros estudios con un peor pronóstico. Por otro lado, las muestras postratamiento revelaron diferencias entre los subgrupos de linfocitos T CD4+ reguladores, con los progresados teniendo un mayor número de reguladoras memoria y los no progresados, de reguladoras naive ( $p$  = 0,020 y 0,027). Además, también se observó un incremento de células positivas para LAG3 en los pacientes no progresados en los linfocitos T dobles negativos (CD4- CD8-) ( $p$  = 0'007).

**Conclusiones:** las Mo-MDSCs y los linfocitos T CD8+ LAG3+ se muestran como un posible futuro biomarcador, accesibles por un método poco invasivo. Su estudio puede, además, ayudar al descubrimiento de nuevos mecanismos moleculares que podrían desencadenar los cambios en los linfocitos T CD4+ reguladores en el caso de Mo-MDSCs.

## Introducción

### **Cáncer. Situación Actual:**

El cáncer, según la Organización Mundial de la Salud, se define como: “*Gran grupo de enfermedades que pueden comenzar en casi cualquier órgano o tejido cuando células anormales crecen de forma descontrolada y van más allá de sus límites habituales para invadir las partes adyacentes y/o expandirse a otros órganos*”. Hoy en día es uno de los principales problemas de salud y representa la segunda causa de muerte a nivel mundial. Solo en Estados Unidos se estima que este año morirán más de medio millón de personas por esta enfermedad.

Actualmente, con la pandemia provocada por la expansión del virus SARS-CoV-2, los sistemas sanitarios están saturados en muchos países. En consecuencia, el acceso a diagnóstico y tratamiento se están viendo afectados, y se pronostica la aparición de una mayor incidencia de casos avanzados y mortalidad (Siegel et al., 2021).

### **Cáncer de Pulmón. Tipos y Clasificación:**

De todas las clases de cáncer, el cáncer de pulmón es el causante del mayor número de muertes, siendo casi un cuarto del total en ambos sexos.

Se clasifica en dos grandes grupos histológicos: el cáncer de células pequeñas (CPCP) y el cáncer de células no pequeñas (CPCNP), siendo este último el mayoritario con un 85%, mientras que CPCP supone un 15%. El CPCNP, a su vez, se subdivide en tres categorías: adenocarcinoma (40% de todos los casos de cáncer de pulmón), carcinoma de células escamosas (25-30%) y carcinoma de células grandes (5-10%) (Duma et al., 2019; Siegel et al., 2021).

Sin embargo, la determinación del estadio del tumor es la información de mayor importancia en cuanto al pronóstico y la decisión del tratamiento. Para ello, actualmente se utiliza la clasificación TNM propuesta por la *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC), que utiliza las características del tumor y la enfermedad para asignar cuatro diferentes estadios (I-IV) (Detterbeck et al., 2017; Duma et al., 2019).

Los parámetros son los siguientes:

- **T o Tumor Primario:** Informa sobre la extensión del tumor primario tomando en cuenta datos como el tamaño, la invasión de estructuras adyacentes (bronquios, pleura, pericardio, ...), o la localización de algún nódulo cercano derivado de este tumor primario; siendo el primero el de mayor importancia.
- **N o Involucración de Nódulos Linfáticos:** Como su nombre indica, informa de la presencia de metástasis en algunos de los nódulos linfáticos regionales y su localización.
- **M o Metástasis Distante:** En los casos con metástasis distante, utiliza la cantidad de focos y su localización para determinar el estadio.

Cada uno tiene sus diferentes categorías y subcategorías (T1, T1a, T1b,...), cuya agrupación da la posibilidad de asignar un estadio a cada uno de los casos (Fig. 1) (Detterbeck et al., 2017).

A

T (Primary Tumor)		Label
T0	No primary tumor	
Tis	Carcinoma in situ (Squamous or Adenocarcinoma)	Tis
T1	Tumor ≤3 cm,	
T1a(mi)	Minimally Invasive Adenocarcinoma	T1a(mi)
T1a	Superficial spreading tumor in central airways <sup>a</sup>	T1a <sub>SS</sub>
T1a	Tumor ≤1 cm	T1a <sub>≤1</sub>
T1b	Tumor >1 but ≤2 cm	T1b <sub>&gt;1-2</sub>
T1c	Tumor >2 but ≤3 cm	T1c <sub>&gt;2-3</sub>
T2	Tumor >3 but ≤5 cm or tumor involving: visceral pleura <sup>a</sup> , main bronchus (not carina), atelectasis to hilum <sup>b</sup>	T2 <sub>Visc Pl</sub> T2 <sub>Centr</sub>
T2a	Tumor >3 but ≤4 cm	T2a <sub>&gt;3-4</sub>
T2b	Tumor >4 but ≤5 cm	T2b <sub>&gt;4-5</sub>
T3	Tumor >5 but ≤7 cm or invading chest wall, pericardium, phrenic nerve or separate tumor nodule(s) in the same lobe	T3 <sub>&gt;5-7</sub> T3 <sub>Inv</sub> T3 <sub>Satell</sub>
T4	Tumor >7 cm or tumor invading: mediastinum, diaphragm, heart, great vessels, recurrent laryngeal nerve, carina, trachea, esophagus, spine; or tumor nodule(s) in a different ipsilateral lobe	T4 <sub>&gt;7</sub> T4 <sub>Inv</sub> T4 <sub>Ipsi Nod</sub>
N (Regional Lymph Nodes)		
N0	No regional node metastasis	
N1	Metastasis in ipsilateral pulmonary or hilar nodes	
N2	Metastasis in ipsilateral mediastinal/subcarinal nodes	
N3	Metastasis in contralateral mediastinal/hilar, or supraclavicular nodes	
M (Distant Metastasis)		
M0	No distant metastasis	
M1a	Malignant pleural/pericardial effusion <sup>c</sup> or pleural /pericardial nodules or separate tumor nodule(s) in a contralateral lobe;	M1a <sub>Pl Dissem</sub> M1a <sub>Contr Nod</sub>
M1b	Single extrathoracic metastasis	M1b <sub>Single</sub>
M1c	Multiple extrathoracic metastases (1 or >1 organ)	M1c <sub>Multi</sub>

TX, NX: T or N status not able to be assessed

<sup>a</sup> Superficial spreading tumor of any size but confined to the tracheal or bronchial wall

<sup>b</sup> such tumors are classified as T2a if >3≤4 cm, T2b if >4≤5 cm.

<sup>c</sup> Pleural effusions are excluded that are cytologically negative, non-bloody, transudative, and clinically judged not to be due to cancer.

B

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

**Figura 1. Tablas guía para la evaluación y asignación de un estadio en cáncer de pulmón según la 8ª edición de la clasificación TNM establecida por la IASLC.** (A) Definiciones de las categorías de TNM (Detterbeck et al., 2017) (B) Tabla para la asignación del estadio según la clasificación TNM (Detterbeck, 2018).

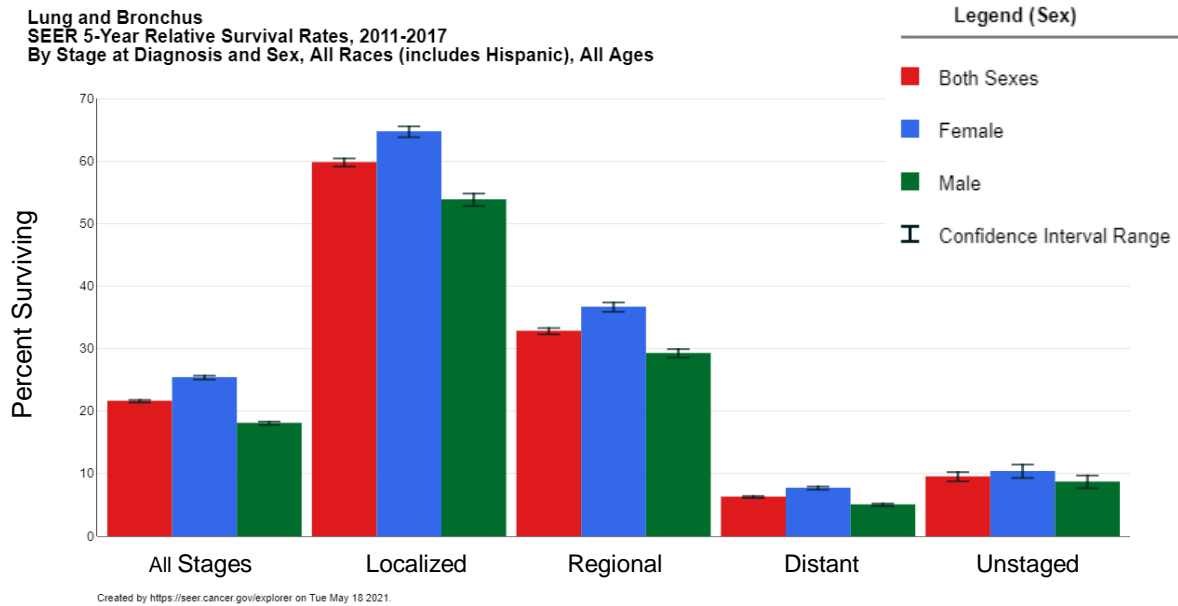
### Cáncer de Pulmón. Tratamiento y Supervivencia:

A pesar de los últimos avances, la tasa de supervivencia en cáncer de pulmón sigue siendo baja (21% de media a los 5 años), con respecto a otras clases de cáncer como el de mama (90%) o próstata (98%). Se estima que estos índices tan bajos son un reflejo de la gran proporción de pacientes que son diagnosticados con metástasis distante (más del 50%), cuya supervivencia es incluso menor (5%). De hecho, la disminución de la mortalidad por cáncer de pulmón, está asociada al descenso de consumo de tabaco en la población más que por las mejoras en el tratamiento (American Cancer Society, 2021; Siegel et al., 2021).

La supervivencia en cáncer de pulmón está determinada, como en el resto de los cánceres, por varios factores como el sexo, la edad, y sobre todo el estadio en el que se encuentran en el momento del diagnóstico (Fig. 2).

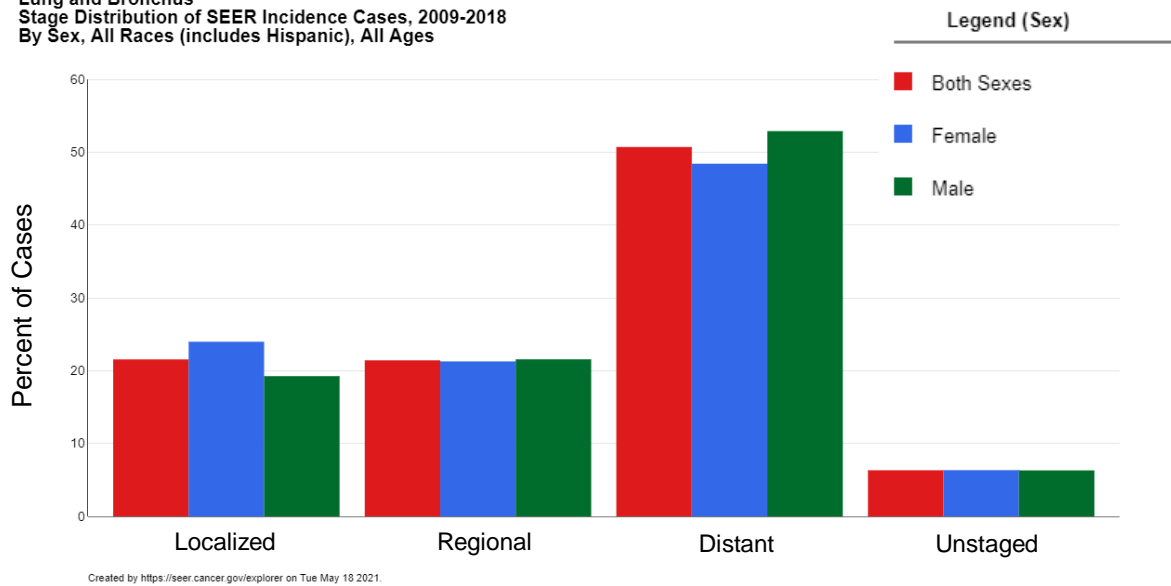
A

Lung and Bronchus  
SEER 5-Year Relative Survival Rates, 2011-2017  
By Stage at Diagnosis and Sex, All Races (includes Hispanic), All Ages



B

Lung and Bronchus  
Stage Distribution of SEER Incidence Cases, 2009-2018  
By Sex, All Races (includes Hispanic), All Ages



C

Type	IA1	IA2	IA3	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	IVA	IVB
Clinical	92	83	77	68	60	53	36	26	13	10	0
Pathologic	90	85	80	73	65	56	41	24	12	-	-

**Figura 2. Gráficas y tabla sobre la supervivencia en cáncer de pulmón.** (A) Gráfica sobre la supervivencia relativa a los 5 años en todas las razas y edades según el estadio en el momento del diagnóstico y el sexo entre los años 2011-2017 (National Cancer Institute, n.d.). (B) Gráfica sobre la incidencia de casos de cáncer de pulmón en todas las razas y edades según el estadio y el sexo entre los años 2009-2018 (National Cancer Institute, n.d.). (C) Tabla con porcentajes de supervivencia a los 5 años para cada uno de los estadios en dos momentos diferentes, el clínico, antes de iniciar cualquier tratamiento; y el patológico, definido por los resultados de una resección quirúrgica (Detterbeck et al., 2017).

El tratamiento se escoge en función del estadio; en los casos con estadios I-II se opta principalmente por la cirugía donde se busca la resección completa del tumor. Para ello, existen diferentes técnicas como la lobectomía, la resección en cuña, la segmentectomía o la neumonectomía. Cada una posee su nivel diferente de invasividad, sus beneficios, complicaciones y limitaciones, que se tendrán en cuenta a la hora de elegir cuál será la más adecuada para cada paciente (Hoy et al., 2019). Además, en el caso de estadios tempranos I-II con afectación ganglionar, la cirugía puede ser complementada a posteriori con quimioterapia, denominándose quimioterapia adyuvante.

Por otro lado, los estadios localmente avanzados (estadios IIIA-IIIB) se trataban tradicionalmente con quimioterapia neo-adyuvante (previa a la posible cirugía). Tras ella, se evalúa la respuesta por PET o TAC y en aquellos pacientes que consiguen negativización de la afectación mediastínica se realiza cirugía posterior (Postmus et al., 2017). En cualquier caso, los resultados obtenidos con el tratamiento quimioterápico previo a la cirugía han sido desalentadores, ya que tan solo un 4% de pacientes consigue eliminar por completo el tumor (Crinò et al., 2010). Sin embargo, gracias a la introducción de nuevos tipos de tratamientos neoadyuvantes, como la inmunoterapia, se están consiguiendo mejores resultados y permite que pacientes con enfermedades más avanzadas (IIIA) también puedan conseguir una resección completa; aunque de momento solo se están aplicando en ensayos clínicos como NADIM (NCT03081689) (Calvo et al., 2020; Provencio et al., 2020)

Finalmente, en casos con tumores no operables y/o con metástasis (estadio IV), su tratamiento consistía históricamente en la administración de quimioterapia basada en platino o taxanos. Actualmente y cada vez más, se desarrollan estudios para intentar aplicar la inmunoterapia, que se basa en la generación o aumento de la respuesta inmune antitumoral, como con la utilización de inhibidores de puntos de control del sistema inmune (ICIs o *Immune Check-point Inhibitors*) (Duma et al., 2019).

### **Inmunoedición. Base de la Inmunoterapia:**

La inmunoterapia se basa conceptos definidos por la teoría de la inmunoedición. Esta consiste en el proceso por el cual el sistema inmune pasa por tres fases en su interacción con las células tumorales (eliminación, equilibrio y escape), hasta que estas consiguen evadir su destrucción. En 2011, esta capacidad fue añadida como uno de los sellos característicos o "*Hallmarks*" del cáncer (Dunn et al., 2002; Hanahan & Weinberg, 2011).

- **Eliminación o Inmunovigilancia:** Durante esta fase, el sistema inmune innato y adaptativo colaboran para reconocer y eliminar células transformadas que hayan escapado los controles de supresión tumoral de la propia célula (como p53). El proceso es el siguiente:

Cuando el tumor adquiere cierto tamaño, su crecimiento invasivo provoca disrupciones en el tejido adyacente, lo que desemboca en una respuesta inflamatoria que recluta a las células del sistema inmune innato (NKT, NK o células  $\gamma\delta$ ), que son estimuladas para la producción de IFN- $\gamma$ . El cual, de forma limitada, puede inducir muerte tumoral mediante mecanismos antiproliferativos y apoptóticos; pero también, provoca la producción de citoquinas desde las células tumorales y las células sanas de los tejidos cercanos.

Algunas de estas citoquinas tienen una acción angiostática (bloqueo de la formación de nuevos vasos sanguíneos) lo que promueve de forma indirecta la muerte tumoral; mientras el resto, reclutan a más células NK y macrófagos al lugar.

Estas células NK infiltrantes en el tumor y los macrófagos se activan mutuamente por la producción de IFN- $\gamma$  e IL-12, y siguen eliminando células tumorales por varios mecanismos como apoptosis dependiente de ligando o perforina, entre otros. Mientras tanto, los restos resultantes de la muerte de las células tumorales son digeridos por las células dendríticas y los transporta a los nódulos linfáticos. En estos nódulos, se induce la generación células T CD4+ *helper* específicas que expresan IFN- $\gamma$  que, a su vez, facilitan el desarrollo de células T CD8+ específicas. Ambos tipos celulares se dirigen al tumor donde las células citotóxicas destruirán las células tumorales con antígeno, cuya inmunogenicidad es promovida por la exposición a IFN- $\gamma$  (Dunn et al., 2002; Hong et al., 2014; O'Donnell et al., 2019).

- **Equilibrio:** Se produce cuando alguna variante celular del tumor consigue escapar de la respuesta inmune y comienza un crecimiento de forma limitada sin provocar manifestaciones clínicas. Es la fase más larga y puede durar incluso años. Estas variantes surgen como consecuencia de la presión a la que son sometidas las células tumorales por el ataque de las células inmunes. Esto, junto a la inestabilidad genética, provoca la generación de múltiples variantes que serán seleccionadas hasta que aquellas con menor inmunogenicidad y con ello mayor capacidad para escapar del sistema inmune, consigan sobrevivir. Algunos ejemplos de estas modificaciones pueden ser, la pérdida de neoantígenos (péptidos con una mayor o menor afinidad que utiliza el sistema inmune para identificar y eliminar las células tumorales), mutaciones que afecten la estabilidad del complejo de histocompatibilidad o MHC (como en la proteína B2M), ... (Dunn et al., 2002; O'Donnell et al., 2019; Rosenthal et al., 2019).
- **Escape:** Se produce cuando las variantes supervivientes finalmente consiguen expandirse de forma descontrolada, gracias al desarrollo de diferentes mecanismos para evitar el desencadenamiento de una respuesta inmune efectiva. Es en este momento, cuando la enfermedad comienza a presentar manifestaciones clínicas (Dunn et al., 2002; O'Donnell et al., 2019).

### **Inmunoterapia:**

Como se ha introducido antes, la inmunoterapia busca dirigir la respuesta inmune hacia un ataque contra el tumor. Para ello, se utilizan agentes que promuevan mecanismos naturales del sistema inmune evadidos por las células tumorales (durante las fases de equilibrio y escape).

El primer tratamiento inmunoterapéutico aprobado por la *US Food and Drug Administration* (FDA) fue la citoquina recombinante IFN $\alpha$  para el tratamiento de la tricoleucemia en 1986. Sin embargo, fue rápidamente reemplazada debido a su corta duración terapéutica. Poco después, en la década de los 90, IL-2 también fue aprobada para el tratamiento de varios tipos de cáncer, aunque estaba asociada a efectos secundarios graves por la necesidad de aplicar una alta dosis.

Este es y sigue siendo uno de los grandes retos a los que se enfrenta la inmunoterapia, la aparición de efectos secundarios graves relacionados con la generación de una respuesta autoinmune. Por ello, surge la necesidad de que los tratamientos sean capaces de generar una respuesta controlada y específica contra los tumores.

Posteriormente, tras unos 10 años de fracasos en el intento de desarrollar varias vacunas, se aprobó el primer ICI para el melanoma avanzado, el ipilimumab. Consistía en un anticuerpo monoclonal dirigido al antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos (CTLA4), encargado de la regulación de su activación, por lo que su inhibición promovía la respuesta antitumoral.

En la actualidad, siguen desarrollándose nuevos medicamentos basados en la inmunoterapia, las principales clases son:

- **Inhibidores de Puntos de Control.** Son los más estudiados. Los dos más comunes son los anticuerpos contra PD-1/PD-L1 y CTLA4. En condiciones fisiológicas, los puntos de control regulan que la respuesta inmune se realice de forma apropiada y controlada, evitando autoinmunidad contra tejidos sanos. Sin embargo, las células tumorales pueden sobreexpresar estos ligandos lo que les permite evadir la acción de los linfocitos. El impacto de esta clase de terapias ha ido en aumento en los últimos años y hay muchos ensayos clínicos en curso. Pero, también tienen sus limitaciones como sus posibles efectos secundarios o la falta de respuesta en muchos pacientes.
- **Citoquinas.** Fueron las primeras en ser aprobadas. Su principal acción es simplemente la estimulación del crecimiento y activación de células inmunes. Las principales clases son: interferones, interleucinas y factores estimulantes de colonias de granulocitos y macrófagos. Presentan los usuales efectos secundarios asociados a inmunoterapias, por lo que se están intentando utilizar en combinación para reducir la dosis y con ello, sus efectos adversos.
- **Células T Modificadas.** Consiste en la extracción de células T sanguíneas del paciente, posteriormente, son genéticamente modificadas para la expresión de CARs (receptores de antígenos quiméricos), específicos para los antígenos tumorales. Vuelven a ser reimplantadas en el paciente, donde reconocerán al antígeno al que van dirigidos y atacarán al tumor. La principal ventaja de este tipo de tratamiento es su larga duración con una sola administración (hasta una década). Sin embargo, sus efectos a largo plazo aún son desconocidos y, además, necesita de la combinación con otras terapias.
- **Agonistas de Receptores Co-Estimuladores.** Los anticuerpos agonistas están dirigidos a receptores de la superficie de las células T para que activen vías intracelulares que promuevan su crecimiento, supervivencia y funciones contra las células tumorales. Los receptores más comunes son los co-estimuladores (CD28) y los receptores de factores de necrosis tumoral (TNFR). Son las que se encuentran en un proceso más temprano de desarrollo.
- **Vacunas.** Se basan en un proceso parecido a las células T modificadas. En este caso, son las células dendríticas de los pacientes las que se recogen y modifican para que expresen antígenos tumorales y activen directamente a las células T para atacar al tumor. Su principal limitación es su falta de eficacia. Se cree que podría mejorar con la identificación de los grupos específicos de este tipo de células que expresan mayores niveles de antígenos y con la mejora de su transporte a los nódulos linfáticos.

En resumen, tras repasar las bases de la inmunoterapia y sus principales opciones como tratamiento, se concluye que esta terapia puede suponer en el futuro una posible cura para el cáncer. Sin embargo, aún no es una alternativa perfecta; no todos los pacientes se benefician por igual ni tienen la misma respuesta y no es posible dirigir de forma controlada y específica la respuesta inmune para evitar efectos adversos (Riley et al., 2019).

### **Biomarcadores Actuales para Predicción de Respuesta y Pronóstico:**

La clave para la mejora y el entendimiento de la heterogeneidad en los tratamientos inmunoterapéuticos, reside en el estudio y desarrollo de biomarcadores cuyos valores permitan predecir y diferenciar a los pacientes que van a responder y beneficiarse, de aquellos que no van a presentar una respuesta; e intentar evitar efectos adversos innecesarios. Para ello, es fundamental el conocimiento en profundidad de las características moleculares de los tumores, debido a la gran heterogeneidad de esta enfermedad entre pacientes, e incluso entre diferentes zonas del mismo tumor (Calvo et al., 2020; Gibney et al., 2016).

Algunos de los posibles biomarcadores en estudio en CPCNP para predecir la respuesta a ICI (la opción más estudiada y en la que se centra este trabajo) son:

- **Expresión de PD-L1:** La inmunohistoquímica para la medición de la expresión de PD-L1, es una de las condiciones para la administración de Pembrolizumab (anticuerpo contra PD-1) según la ficha técnica de la Agencia Europea del Medicamento (EMA). Es lógico suponer que para que el tratamiento desarrolle una respuesta, debe existir una expresión significativa, y existen varios estudios que lo corroboran como KEYNOTE-001. En este estudio, se observó que los pacientes que presentaba al menos un 50% de expresión PD-L1 tenían mayores probabilidades de generar respuesta (45.2%) que aquellos con una expresión menor (16.5%). Sin embargo, no es del todo efectivo. Hay una proporción considerable de pacientes con altas expresiones que no presentan respuesta; mientras otros, con expresiones consideradas bajas, aún pueden responder al tratamiento. Se cree que es debido a que la expresión de PD-L1 es bastante variable, tanto espacial como temporalmente. La toma de una muestra en un momento determinado, no representaría de manera efectiva la situación del tumor (Calvo et al., 2020; European Medicines Agency - EMA, 2015; Garon et al., 2015; Gibney et al., 2016).
- **Linfocitos Infiltrantes al Tumor:** Están asociados a una mejor supervivencia en varios tipos de cáncer. En concreto, en CPCNP una densidad alta de linfocitos CD8+ en el tumor está relacionado con una mejor supervivencia general y libre de progresión. La posible explicación reside en el reconocimiento inmune de los tumores, que desemboca en una respuesta inflamatoria ligada a los linfocitos T y que mejoraría el pronóstico de la enfermedad. Por ello la presencia de estos linfocitos está asociada con una buena respuesta a los tratamientos inmunes. A pesar de ello, presenta los mismos problemas que el anterior y falla en una proporción considerable como para establecerse como un biomarcador predictivo efectivo (Gibney et al., 2016; Tokito et al., 2016).
- **Carga Mutacional Tumoral (TMB, *Tumor Mutational Burden*):** Las mutaciones que sufren las células tumorales son capaces de generar neoantígenos que son reconocidos por el sistema inmune y provocar una respuesta inmune adaptativa.

Por ello, una mayor carga mutacional tumoral está relacionada a una mayor actividad inmune, y con ello a una probabilidad mayor de respuesta a inmunoterapia. Para intentar incrementar el valor predictivo de este biomarcador se ha propuesto tener en cuenta la heterogeneidad de estas mutaciones (Gibney et al., 2016).

- **Marcadores en Sangre Periférica:** La toma de muestras tumorales por biopsia es un proceso complejo y que no siempre está disponible en todos los pacientes. Esta clase de biomarcadores, en cambio, debido a su menor invasividad, suponen un método más accesible. Sin embargo, todavía no se ha aprobado ningún biomarcador de este tipo. También ofrece múltiples posibilidades que investigar en la búsqueda de biomarcadores con técnicas como: “*Next Generation Sequencing*” (NGS), citometría de masas, ELISA, citometría de flujo... Esta última permite un análisis multiparamétrico célula a célula a partir de la muestra completa, una fracción como PBMCs aisladas (células mononucleares de sangre periférica) o incluso de células tumorales circulantes (Gibney et al., 2016; Nixon et al., 2019). Algunos de los posibles biomarcadores que podemos encontrar en sangre periférica son los siguientes:
  - **Contaje y/o ratio de las diferentes poblaciones inmunes** → Ratio neutrófilos-linfocitos (NLR) / Número total de linfocitos o poblaciones más específicas como T CD8+ o CD4+.
  - **Células T CD8+** → Expresión de marcadores de proliferación como Ki67 / Expresión de ICIs como PD-1 o PD-L1 / Distribución de linfocitos T CD8+ de memoria vs resto de linfocitos T CD8+.
  - **Células T CD4+** → Proliferación / Expresión de ICIs / Identificación y proporción de poblaciones específicas de CD4+ (Th9) / Cantidad de células T reguladoras.
  - **Células NK** → Expresión de CD69 (marcador de células NK activadas). Limitado por su actividad centrada en el microambiente tumoral (TME).
  - **MDSCs (células supresoras derivadas de mieloides)** → Porcentaje de MDSCs en sangre periférica / Cantidad de M-MDSCs (células monocíticas) circulantes (Hernandez et al., 2020).

### **Objetivo del Trabajo:**

Este trabajo se centrará, por un lado, en la búsqueda de biomarcadores más fiables para mejorar la selección de pacientes, según su posible respuesta y pronóstico con el uso de las muestras basales. Mientras que, con las muestras postratamiento se intentará relacionar los cambios entre ambos grupos con los posibles mecanismos del tratamiento y de progresión tumoral.

Para ello, se utilizarán la fracción de PBMCs procedentes de muestras sanguíneas de los pacientes. Esta es una fuente importante de información sobre la respuesta inmune e incluso refleja parte de la situación linfocitaria en el tumor (linfocitos infiltrantes del tumor o TILs). Este análisis se realizará por citometría de flujo, que determina el fenotipo molecular en varios tipos celulares a la vez. Además, se analizarán diferentes paneles de marcadores que permitan caracterizar en profundidad los cambios inmunológicos del paciente durante su tratamiento en poblaciones celulares específicas (linfocitos TCD4+, TCD8+, T *exhausted* y células mieloides).

## Materiales y Métodos

### **Selección de Pacientes y Directrices Éticas:**

La selección de los pacientes se llevó a cabo a partir de junio del año 2018. Los criterios de inclusión para entrar en la población de estudio fueron: diagnóstico de CPCNP avanzado (estadio IV) y tratamiento con inmunoterapia, con fármacos aprobados en el momento del estudio (Nivolumab, Pembrolizumab, Atezolizumab). Por otro lado, el no consentimiento informado de los pacientes fue el principal criterio de exclusión. La población del estudio fue finalmente de 64 pacientes.

El Hospital Puerta de Hierro, fue el centro de origen de las muestras obtenidas. Este se encuentra regulado por la normativa bioética nacional e internacional relacionada con muestras biológicas (código deontológico y Declaración de Helsinki), y también por la normativa legal sobre la confidencialidad de los datos (LOPD 15/1999). Por todo ello, el estudio está aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) y el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA).

### **Recogida de Muestras:**

Las muestras sanguíneas fueron recogidas en el momento antes de comenzar el tratamiento y un año después en el caso de los pacientes cuya enfermedad no hubiera progresado, en cuyo caso se tomó la segunda muestra en el momento de la detección de esa progresión.

Se recogían 10 ml de sangre periférica en tubos de tipo EDTA (anticoagulante para la conservación de las células sanguíneas), y enviadas en un período inferior a 2 horas para su procesamiento como previsión de la pérdida de calidad de las muestras para su posterior análisis.

### **Aislamiento de fracción de PBMCs:**

El procesamiento para la obtención de las poblaciones de interés consistió en los siguientes pasos: dilución 1:1 en RPMI 1640 (medio de cultivo celular), añadir la muestra sobre 1/3 de Lymphoprep (medio de gradiente de densidad) con un 1/3 del volumen de la dilución de sangre, centrifugación de la mezcla durante 25 minutos a 1200 rpm con frenado en vacío en una centrífuga basculante, recogida de PBMCs con ayuda de una pipeta Pasteur, centrifugación de PBMCs obtenidas durante 10 minutos a 1800 rpm, resuspensión del sedimento en 10 ml de RPMI 1640, conteo de la cantidad de células, división en alícuotas para su conservación por criogenización con DMSO (criopreservante) hasta el momento de su análisis por citometría de flujo. El protocolo de aislamiento seguido durante el estudio se encuentra en el Anexo 1.

### **Citometría de Flujo:**

Las poblaciones de PBMCs fueron analizadas en un citómetro MACS Quant Analyzer 10. Cada muestra fue repartida para cuatro paneles diseñados para el análisis de poblaciones diferentes y con su propia combinación de anticuerpos.

La preparación de las muestras criogenizadas hasta el momento de su llegada al citómetro fue la siguiente: descongelación rápida en baño, dilución en FACs (PBS + 5% FBS), repartir 1 ml a cada tubo eppendorf (4 paneles + tubo blanco o control), centrifugación para eliminar restos de DMSO, resuspensión e incubación en mix con FcR Blocking (para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos) y Fixable Violet Dead Cell Stain (tinción fluorescente para la determinación de viabilidad de las células antes de su fijación), lavado con PBS y centrifugación, resuspensión e incubación en mix de tinción de anticuerpos (la correspondiente a cada panel y PBS en el tubo blanco), lavado, resuspensión e incubación en paraformaldehído 1% (fijación de la células), lavado y resuspensión en PBS. El protocolo de preparación seguido durante el estudio se encuentra en el Anexo 2.

La combinación de anticuerpos utilizada para cada panel fue:

#### P1 - Células T CD4+

- **CD3 - PerCP** --> Células T.
- **CD4 - Viogreen** --> Células T CD4+ o *helper*.
- **CD25 - PE-Cy7** --> Células T reguladoras.
- **CD127 - PE** --> Células T maduras.
- **CD45RA - APC-Vio770** --> Células inactivadas.
- **CD45RO - FITC** --> Células activadas y/o de memoria.

#### P2 - Células T CD8+

- **CD3 - PerCP** --> Células T.
- **CD8 - Viogreen** --> Células T CD8+ o citotóxicas.
- **CD197/CCR7 - PE-Cy7** --> Migración en células T indiferenciadas o reguladoras.
- **CD62L - PE** --> Migración.
- **CD45RA - APC-Vio770** --> Células inactivadas.
- **CD45RO - FITC** --> Células activadas y/o de memoria.

#### P3 - Células T Exhausted

- **CD3 - PerCP** --> Células T
- **CD4 - Viogreen** --> Células T CD4+ o *helper*.
- **CD279/PD1 - PE-Cy7** --> Receptor de punto de control del sistema inmune.
- **CD28 - PE** --> Senescencia.
- **CD8 - APC-Cy7** --> Células T CD8+ o citotóxicas.
- **CD223/LAG3 - APC** --> Receptor de punto de control del sistema inmune.
- **CD274/PDL1 - FITC** --> Ligando de PD1.

#### P4 - Células Mieloides

- **CD33 - PerCP** --> Linaje mieloides.
- **CD11b - Viogreen** --> Monocitos y macrófagos de linaje mieloides.
- **CD279/PD1 - PE-Cy7** --> Receptor de punto de control del sistema inmune.
- **HLA-DR - PE** --> Células presentadoras de antígenos.
- **CD163 - APC-Cy7** --> Macrófagos tipo M2, monocitos y otras células de linaje mieloides.
- **CD14 - APC** --> Monocitos y macrófagos de linaje mieloides.
- **CD274/PDL1 - FITC** --> Ligando de PD1.

### **Análisis de los Resultados y Estadística:**

La estrategia de análisis y obtención de los resultados de las muestras procesadas por citometría de flujo fueron realizadas mediante el software FlowJo v10. Las estrategias para cada panel están incluidas en el anexo 3.

Por otro lado, los análisis estadísticos fueron realizados con IBM Statistics 25. En cuanto a las variables clínicas, las de tipo categórico se analizaron con el test Chi cuadrado; mientras que con las continuas se utilizó t-Student (ambos test con  $n = 64$ ). Las variables moleculares fueron analizadas para muestras de condición no paramétrica con el test U de Mann-Whitney. Los estudios de supervivencia, para comprobar la asociación de los posibles biomarcadores con la supervivencia libre de progresión (SLP), se realizaron mediante curvas de Kaplan-Meier y las diferencias significativas se analizaron por el test Log Rank para obtener el p valor.

Finalmente, las gráficas utilizadas para las figuras fueron diseñadas por el software GraphPad Prism 6.

## Resultados

### 1. Características clínicas de la cohorte de pacientes.

	Pacientes No Progresados (n=31)	Pacientes Progresados (n=31)	Pacientes Totales (n=64)	Significancia p valor
<b>Edad, años</b>	68 (64-74,5)	65 (60,5-71,5)	67 (61-73)	0,128
<b>Sexo</b>				0,180
<b>Masculino</b>	23 (74%)	18 (58%)	43 (67%)	
<b>Femenino</b>	8 (26%)	13 (42%)	21 (33%)	
<b>Escala ECOG<sup>1</sup></b>				0,486
<b>0</b>	12 (39%)	9 (29%)	22 (34%)	
<b>1</b>	15 (48%)	16 (52%)	32 (50%)	
<b>2</b>	3 (10%)	6 (19%)	9 (14%)	
<b>Desconocido</b>	1 (3%)	0 (0%)	1 (2%)	
<b>Tabaquismo</b>				0,525
<b>Nunca Fumador</b>	2 (7%)	2 (7%)	4 (6%)	
<b>Exfumador (&gt;1 año)</b>	22 (71%)	18 (58%)	41 (64%)	
<b>Fumador Activo</b>	7 (22%)	11 (35%)	19 (30%)	
<b>Histología</b>				0,285
<b>Adenocarcinoma</b>	22 (71%)	20 (65%)	43 (67%)	
<b>Carcinoma escamoso</b>	5 (17%)	7 (23%)	12 (18%)	
<b>Otros</b>	3 (9%)	0 (0%)	3 (5%)	
<b>No especificado</b>	1 (3%)	4 (12%)	6 (10%)	
<b>Estadío-Diagnóstico<sup>2</sup></b>				0,778
<b>I-II</b>	2 (7%)	0 (0%)	3 (5%)	
<b>III</b>	8 (26%)	7 (22%)	15 (23%)	
<b>IVA</b>	6 (19%)	5 (17%)	11 (17%)	
<b>IVB</b>	15 (48%)	19 (61%)	35 (55%)	
<b>Tratamientos Anteriores</b>				
<b>QT Adyuvante</b>	1 (3%)	1 (3%)	3 (5%)	0,554
<b>RT Adyuvante</b>	1 (3%)	0 (0%)	1 (3%)	0,313
<b>QT/RT Radical</b>	6 (19%)	7 (22%)	13 (20%)	0,755
<b>Fármaco Inmunoterapia</b>				0,530
<b>Atezolizumab</b>	0 (0%)	1 (3%)	2 (3%)	
<b>Nivolumab</b>	18 (58%)	20 (65%)	38 (59%)	
<b>Pembrolizumab</b>	12 (39%)	10 (32%)	23 (36%)	
<b>Desconocido</b>	1 (3%)	0 (0%)	1 (3%)	

**Tabla 1. Estadísticas demográficas y características clínicas de la población de estudio.** Los datos mostrados corresponden a n (%) o mediana (IQR o Rango Intercuartílico). <sup>1</sup>ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group. <sup>2</sup>Estadío correspondiente al momento del diagnóstico de la enfermedad (actualmente todos son estadio avanzado, criterio de inclusión).

---

Las características clínicas de la población final de estudio (n = 64 pacientes) se encuentran recogidas en la Tabla 1. Todos ellos recibieron al menos una dosis de tratamiento inmune basado en ICIs, entre los años 2018 y 2020, siendo Nivolumab el fármaco mayoritario con 38 pacientes (59%). La mediana de seguimiento fue de 8 meses (IQR, 3 – 20), siendo el día 12 de mayo de 2021 la fecha de la última actualización de la base de datos clínica.

La mediana de edad de los pacientes se sitúa en 67 años (IQR, 61 – 73) y 43 de ellos (67%) eran hombres. La histología predominante con 43 pacientes (67%), fue el adenocarcinoma, y 54 pacientes (84%) presentaban, según la escala ECOG, un buen estado (0-1) en el momento previo al tratamiento.

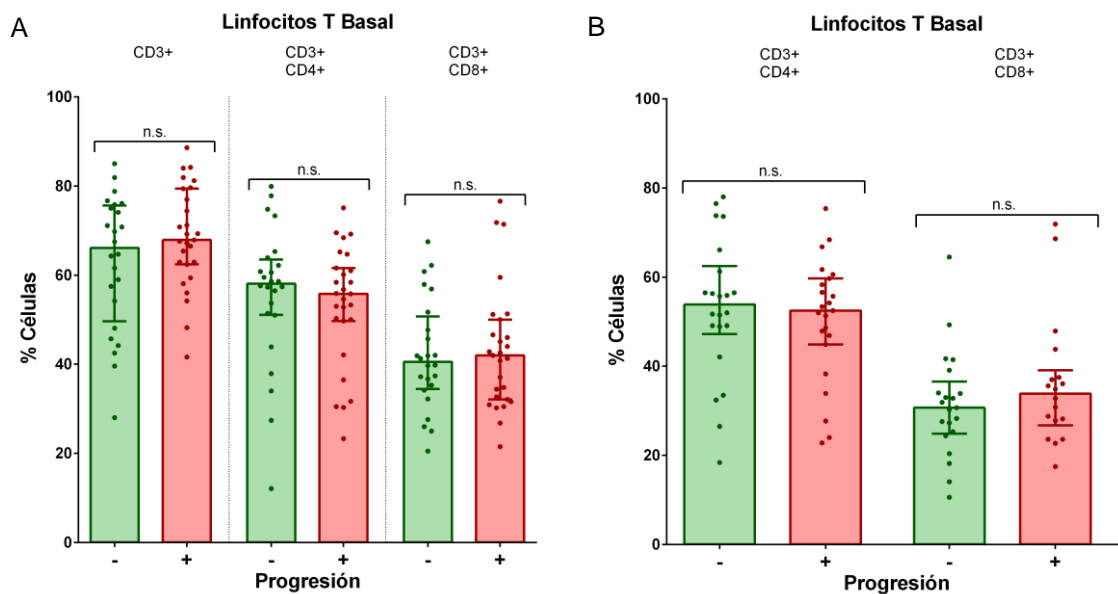
A pesar de que algunos de ellos habían recibido otros tratamientos o fueron diagnosticados con estadios más leves antes del comienzo del estudio, ninguna de las variables clínicas basales mostró diferencias significativas entre los pacientes progresados y los no progresados en el período de un año (p valores en Tabla 1). Para ello, las variables categóricas (sexo, escala ECOG, etc) fueron analizadas mediante el test de Chi cuadrado; mientras que las variables continuas (edad), en cambio, se utilizó t-student (n = 64).

## **2. Inmunofenotipo basal en las poblaciones generales linfocitarias.**

La fracción de PBMCs aislada de las muestras sanguíneas basales de los pacientes fueron analizadas por citometría de flujo para cuatro paneles diferentes con su correspondiente combinación de anticuerpos dirigida a una población celular específica.

Como primer paso, se procedió a la búsqueda de posibles diferencias que pudieran existir en las principales clases celulares como los linfocitos T (CD3+); clasificados en linfocitos T CD4+ o helper, y linfocitos T CD8+ o citotóxicos. Este análisis, se podía realizar combinando los resultados de los dos primeros paneles, cada uno enfocado a una clase de linfocito T diferente; o utilizando el tercer panel, que combinaba los marcadores para la detección de los dos, ambos están representados en las figuras 1A (tercer panel) y 1B (primer y segundo panel).

Los análisis estadísticos se hicieron por medio del test U de Mann-Whitney para muestras de condición no paramétrica. En el tercer panel (Fig. 1A), para una n = 51 muestras, ni los linfocitos T CD3+ (67,9%, IQR 59 – 76,1 / p = 0,261), ni los CD3+ CD4+ (57,3%, 50 – 62,2 / p = 0,365), ni los CD3+ CD8+ (41,3%, 32,7 – 50 / p = 0,850) resultaron tener diferencias significativas entre los pacientes progresados (+) y los no progresados (-). Tampoco se observaron diferencias significativas durante el análisis de los dos primeros paneles en estas poblaciones (Fig. 1B).



**Figura 1. Poblaciones linfocitarias basales según su progresión en un año.** (A) Porcentaje de las principales poblaciones linfocitarias en el momento previo a la administración del tratamiento según la progresión en el período de un año, mediante el estudio del tercer panel (Linfocitos T CD4+ y CD8+). (B) Porcentaje de las principales poblaciones linfocitarias en el momento previo a la administración del tratamiento según la progresión en el período de un año, mediante el estudio del primer (linfocitos T CD4+) y segundo panel (linfocitos T CD8+).

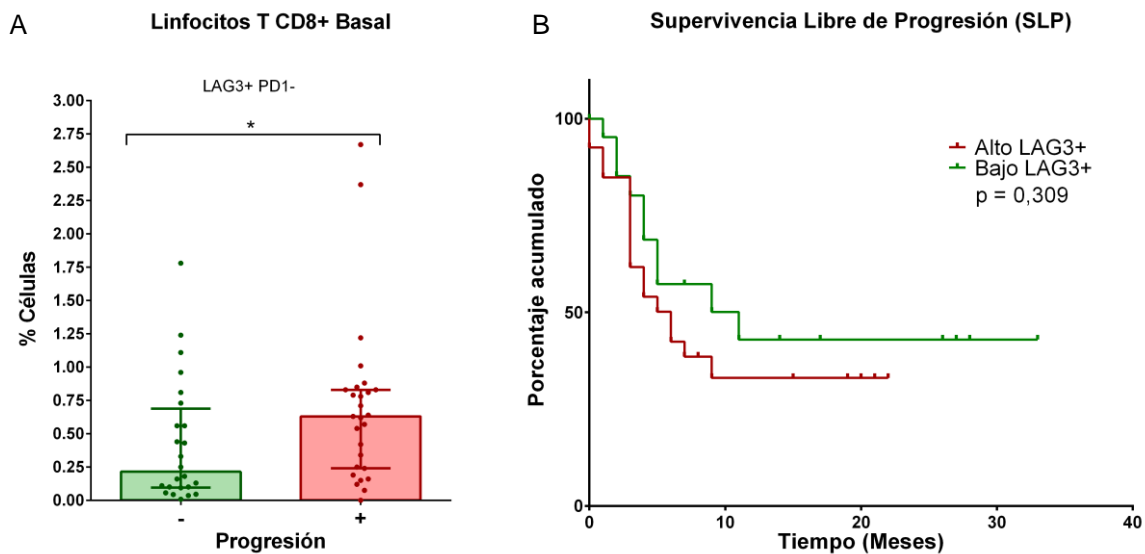
### 3. Expresión basal de LAG3 en los linfocitos T CD8+.

Tras estudiar las poblaciones generales, también se analizó la presencia de diferentes moléculas en el tercer panel como puntos de control del sistema inmune (PD1, PDL1 y LAG3), o marcadores de senescencia (CD28).

En los primeros análisis de cada molécula por separado, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los dos tipos de linfocitos T. Posteriormente, se procedió a un análisis doble donde se emplearían diferentes combinaciones de las moléculas en cada eje (PD1 vs PDL1 / LAG3 vs PD1 / CD28 vs LAG3 / ...). Mediante el análisis estadístico U de Mann-Whitney para  $n = 51$  muestras, se observó que los pacientes progresados mostraban un incremento en la expresión de LAG3 en los linfocitos T CD8+ que eran negativos para PD1 ( $p = 0,039 / 0,63\%$ ,  $0,245 - 0,83$  vs  $0,215\%$ ,  $0,099 - 0,603$ ) (Fig. 2A).

A raíz de estos resultados, se realizó un estudio de supervivencia para comprobar la relación de la cantidad de células positivas para LAG3 en linfocitos T CD8+ PD1- con la SLP. Para ello, se utilizó el método de Kaplan-Meier para ver la posible separación de las curvas y la prueba de Mantel-Cox o Log Rank para ver si esa separación mostraba una diferencia significativa (Fig. 2B). Además, para determinar la clasificación de los pacientes según el porcentaje de células T CD8+ PD1- LAG3+ en dos grupos (Alto y Bajo), se empleó la mediana de toda la cohorte como punto de corte (0,47%).

A pesar de tener una leve separación entre las curvas de bajo y alto nivel de expresión, la prueba estadística no mostró que la diferencia fuera significativa ( $p = 0,309$ ).



**Figura 2. Expresión basal de LAG3 en los linfocitos CD8+ según la progresión y su relación con la supervivencia libre de progresión (SLP).** (A) Porcentaje de células LAG3+ PD1- en los linfocitos T CD8+ en el momento previo a la administración del tratamiento según la progresión de los pacientes. (B) Curva SLP de Kaplan-Meier en relación al nivel de expresión de LAG3 en los linfocitos T CD8+.

#### 4. Células Mo-MDSCs como posible biomarcador.

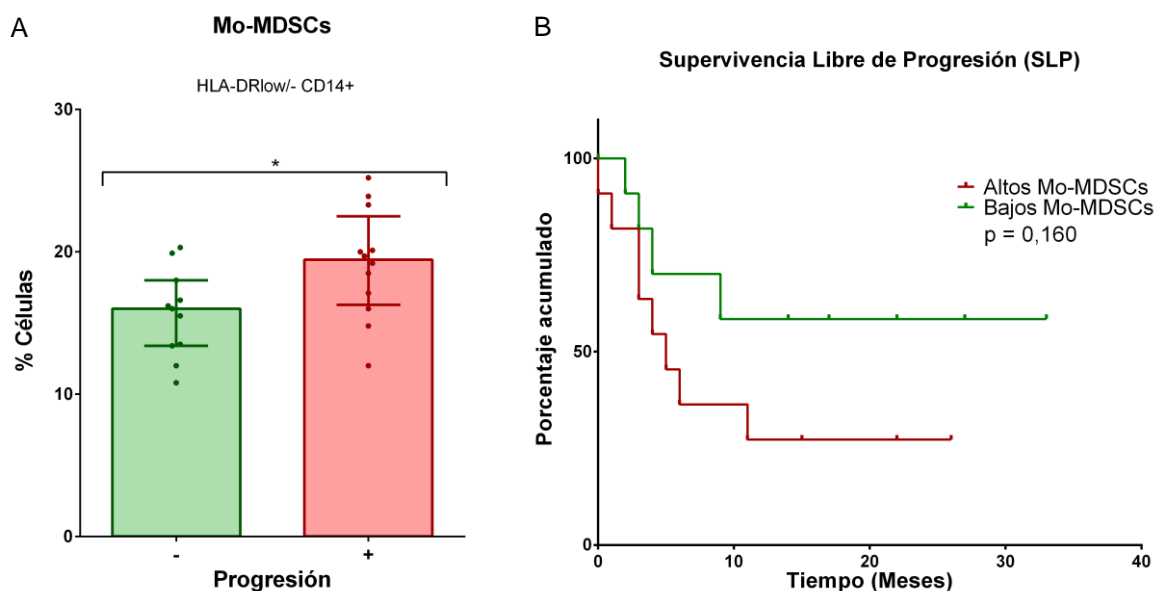
Tras repasar el análisis de las poblaciones linfocitarias a través de los tres primeros paneles de anticuerpos, se realiza el estudio del cuarto panel, enfocado en las células mieloides.

En este panel podemos diferenciar dos principales poblaciones de monocitos, los HLA-DR+ CD14+ y los HLA-DRIow/- CD14+, que corresponderían a las células supresoras derivadas de mieloides de tipo monocítico (debido a que estamos tomando en cuenta la fracción de PBMCs) o Mo-MDSCs (Hoechst et al., 2008).

El análisis de las muestras basales mediante el test U de Mann-Whitney para  $n = 23$  muestras, mostró un nivel superior de Mo-MDSCs en el grupo de pacientes progresados que en los pacientes no progresados ( $p = 0,042 / 19,45\%$ ,  $16,825 - 20,9$  vs  $16\%$ ,  $13,45 - 17,3$ ) (Fig 3A).

Al igual que con la expresión basal de LAG3 en los linfocitos T CD8+, se procedió a la realización de un estudio de supervivencia para comprobar la relación de la cantidad de Mo-MDSCs con la SLP en el período de un año. Además, también se utilizó la mediana de toda la cohorte de estudio como punto de corte entre los grupos de alto y bajo nivel de Mo-MDSCs (17,55%).

Los resultados obtenidos por el método Kaplan-Meier y el test estadístico Log Rank para una  $n = 23$  muestras; mostraron unas curvas separadas, pero sin una diferencia significativa entre ellas ( $p = 0,16$ ) (Fig. 3B).



**Figura 3. Proporción basal de Mo-MDSCs según la progresión y su relación con la SLP.** (A) Porcentaje de células Mo-MDSCs (HLA-DR<sup>low/-</sup> CD14<sup>+</sup>) en el momento previo al tratamiento según la progresión de los pacientes en el período de un año. (B) Curva SLP Kaplan-Meier según el nivel de Mo-MDSCs.

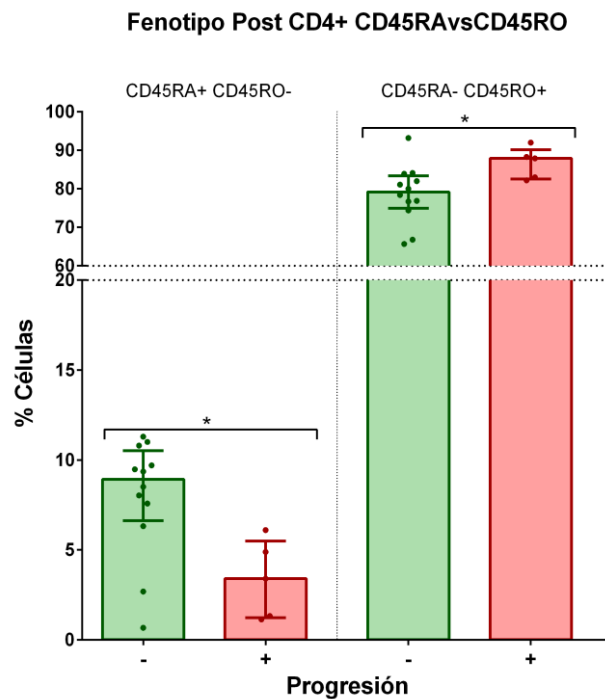
### 5. Diferencias en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reguladores tras el tratamiento.

Tras el estudio de las poblaciones linfocitarias en el momento basal, continuamos con el análisis de las muestras postratamiento, obtenidas un año después en el caso de los no progresados, y en el momento de la detección de una progresión en los pacientes que progresaron antes de ese tiempo.

Al igual que con las muestras basales, el análisis estadístico empleado fue el test U de Mann-Whitney. En el primer panel, enfocado a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y sus diferentes subgrupos, se observaron diferencias significativas en el grupo de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reguladores, caracterizados por un marcaje CD127<sup>low/-</sup> CD25<sup>+</sup> (Yu et al., 2012).

En concreto, para una  $n = 17$  muestras, los pacientes no progresados mostraban un porcentaje mayor en la población CD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup> ( $p = 0,020 / 8,935\%$ , 7,265 – 9,975 vs 3,4%, 1,32 – 4,89), mientras que el grupo de progresados tenían mayor cantidad de CD45RA<sup>-</sup> CD45RO<sup>+</sup> ( $p = 0,027 / 79,2\%$ , 76,125 – 82,475 vs 87,9%, 83 – 88,3) (Fig. 4).

Estas poblaciones representan por una lado, los linfocitos T reguladores naive (CD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup>) y los linfocitos T reguladores de memoria (CD45RA<sup>-</sup> CD45RO<sup>+</sup>) (Arroyo Hornero et al., 2017).



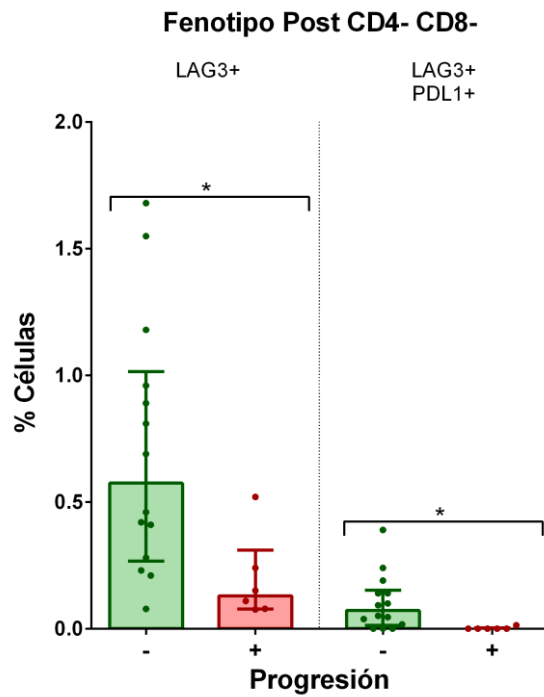
**Figura 4. Linfocitos T CD4+ reguladores postratamiento según la progresión de los pacientes en un año.** Porcentajes de los linfocitos T CD4+ reguladores (CD127low/- y CD25+) en las muestras obtenidas postratamiento, clasificadas según la progresión de los pacientes y la expresión de CD45RA o CD45RO.

## 6. Expresión de LAG3 y PDL1 en linfocitos T tras el tratamiento.

De forma similar al estudio de las muestras basales, también se analizó la presencia de moléculas extracelulares a través del tercer panel. Por lo que, mediante el test U de Mann-Whitney se realiza la búsqueda de alguna diferencia significativa, tanto por el análisis simple de cada molécula por separado, como por el análisis por parejas.

No se encuentran diferencias en las principales poblaciones linfocitarias como CD4+ o CD8+. Sin embargo, al comprobar los resultados en las combinaciones de estos dos marcadores, se observa como para una  $n = 20$  muestras, los pacientes pertenecientes al grupo de no progresados tienen un mayor porcentaje de células positiva para LAG3 en los linfocitos T CD3+ y doble negativos para CD4 y CD8 ( $p = 0,017 / 0,575\%$ ,  $0,313 - 0,943$  vs  $0,13\%$ ,  $0,087 - 0,218$ ) (Fig. 5).

Con el análisis por parejas se vuelve a reconfirmar este incremento de LAG3 en los linfocitos T doble negativos, en concreto, el análisis muestra como los pacientes no progresados tienen una mayor cantidad de células dobles negativas con expresión de LAG3 y PDL1 ( $p = 0,007 / 0,072\%$ ,  $0,023 - 0,14$  vs  $0\%$ ).



**Figura 5. Expresión de LAG3 y PDL1 en linfocitos T CD4- CD8- o dobles negativos tras el tratamiento según su progresión en un año.** Porcentajes de células LAG3+, y LAG3+ PDL1+ en las muestras tras el tratamiento y clasificadas según su progresión en un año.

## Discusión:

La búsqueda de biomarcadores en sangre periférica es una forma cómoda y poco invasiva de obtener información sobre la situación inmune de los pacientes, en comparación, por ejemplo, a una biopsia. Sin embargo, también debemos tener en cuenta que el CPCNP es una enfermedad bastante heterogénea, que dificulta la búsqueda de biomarcadores para predecir el pronóstico futuro de cada paciente.

Esta puede ser una de las razones por las cuales no observamos en nuestra cohorte diferencias significativas entre los pacientes progresados y no progresados, en las principales poblaciones linfocitarias. Sin embargo, la cantidad de linfocitos está propuesta como uno de los posibles biomarcadores linfocitarios y se ha observado relación entre el incremento de los linfocitos CD4+ y CD8+ con una buena respuesta a inmunoterapia de tipo ICI (Hernandez et al., 2020; Martens et al., 2016).

Por otro lado, al analizar las células de tipo mieloide, sí que se encontró una diferencia significativa. En concreto, las Mo-MDSCs caracterizadas por un marcaje HLA-DR<sup>low/-</sup> y CD14<sup>+</sup> (Hoechst et al., 2008) se mostraron en unos niveles significativamente superiores en aquellos pacientes que progresaron en el período de un año.

Teniendo en cuenta que estas muestras previas a la administración del tratamiento, se realizó un estudio de supervivencia para comprobar su posible asociación con la SLP y potencial como posible biomarcador pronóstico. Estos análisis mostraron como la curva perteneciente al grupo de pacientes con un alto nivel de estas células, mostraban una mayor tendencia a la progresión.

Sin embargo, las diferencias no eran estadísticamente significativas. Probablemente, podría ser debido a la baja cantidad de pacientes con muestras válidas para este panel. En este grupo celular observamos una peor conservación que en la población linfocitaria. Por ello, para las muestras con menor viabilidad se priorizaron los análisis linfocitarios, dejando un número menor de muestras analizadas para el cuarto panel (n = 23).

Las MDSCs son un grupo celular caracterizado por aparecer en momentos patológicos relacionados con inflamación crónica y recientemente han sido considerados como uno de los contribuyentes a la progresión tumoral, gracias a su acción inmunosupresora. Estas se clasifican principalmente en dos grupos, las polimorfonucleares PMN-MDSCs (que se retiran tras aislar la fracción de PBMCs) y las de tipo monocítico o Mo-MDSCs (que se mantienen en la fracción de PBMCs y son detectadas por el marcaje HLA-DR) (Gabilovich, 2017).

Se ha relacionado la presencia de este tipo celular con un peor pronóstico y también, con una peor respuesta a tratamientos inmunes de tipo ICI en varios tipos de cáncer, entre ellos el cáncer de pulmón. Debido a esto, numerosos estudios están señalando a las MDSCs como una potencial diana para el desarrollo de nuevos tratamientos inmunes (Gabilovich, 2017; Law et al., 2020).

Nuestros resultados, así como los de otros grupos de investigación apoyarían la investigación de las MDSCs, debido a su potencial como fuente de biomarcadores, y de mecanismos para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas. Sin embargo, aún hay aspectos que deben mejorarse, como la detección de las PMN-MDSCs, que no tiene aún un marcador tan definido como las Mo-MDSCs para su correcta separación del resto de células, o el establecimiento de un protocolo estandarizado para la determinación del nivel de estas células.

Por otro lado, en la población de linfocitos T CD8+ y PDL1-, la cantidad de células positivas para LAG3+ a nivel basal, también fue significativamente superior en aquellos pacientes cuya enfermedad progresó antes de 1 año.

LAG3 junto con PD1, son receptores que forman parte de los puntos de control del sistema inmune. Los linfocitos T CD8+ que expresan esta molécula, presenta un fenotipo exhausto con un déficit en la producción de citoquinas proinflamatorias como IFN $\gamma$  (importante para la producción de la respuesta inmune contra el tumor). De forma fisiológica es un mecanismo de tolerancia, evitando problemas de autoinmunidad, pero en el contexto del cáncer se considera un mecanismo que utiliza el tumor para escapar del sistema inmune, por lo que también está considerado como uno de los objetivos de la inmunoterapia.

Sin embargo, aún hay aspectos que permanecen desconocidos en relación a este receptor, como su funcionamiento, el impacto en otros tipos celulares, o su relación con la SLP en pacientes de cáncer y con ello su valor como posible biomarcador (Andrews et al., 2017).

Finalmente, en cuanto a los resultados en las muestras postratamiento, estas se centran en detectar los posibles mecanismos que desencadenan la respuesta al tratamiento o la progresión de la enfermedad.

En el caso de los linfocitos T CD4+, los cambios significativos fueron detectados en las poblaciones de linfocitos T reguladores. Específicamente, los pacientes progresados mostraban un nivel mayor de linfocitos T reguladores de memoria, mientras que los pacientes no progresados tenían más linfocitos T reguladores naive.

Los linfocitos T CD4+ reguladores (CD127<sup>low/-</sup> CD25<sup>+</sup>) son un grupo celular que en condiciones fisiológicas acude ante situaciones inflamatorias para inhibir la acción de los linfocitos efectoras como los linfocitos T CD8+ citotóxicos o los linfocitos T CD4+ colaboradores. En el contexto del cáncer, esto se traduce como un mecanismo de escape del sistema inmune (Togashi et al., 2019; Yu et al., 2012).

Su clasificación se puede realizar de diferentes maneras, en este estudio se ha empleado el marcaje CD45RA vs CD45RO gracias al cual, hemos podido separar dos grupos complementarios (por ello, cuando un paciente tiene un mayor porcentaje de una clase en particular, tendrá menos del otro tipo celular), estos son: linfocitos T reguladores naive (CD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup>) y linfocitos T reguladores de memoria (CD45RA<sup>-</sup> CD45RO<sup>+</sup>) (Arroyo Hornero et al., 2017).

Estas células actúan de manera similar ante su activación antigénica con una respuesta proliferativa. Sin embargo, las naive poseen una menor capacidad inmunosupresora y proliferativa en comparación con las reguladoras de memoria (Arroyo Hornero et al., 2017; Golubovskaya & Wu, 2016; Togashi et al., 2019).

Además, en otro estudio se observó que las células MDSCs producen la inducción de los linfocitos T reguladores como mecanismo para la inmunosupresión (Hoechst et al., 2008); por lo que el estudio en profundidad de estos dos tipos celulares podría ayudar a entender los mecanismos de la progresión y con ello el desarrollo de nuevas terapias más efectivas.

Otro resultado significativo en las muestras postratamiento, fue una mayor presencia de LAG3 y PDL1 en los linfocitos T doble negativos (CD4- CD8-) de los pacientes no progresados, por lo que podría parecer que las dobles negativas favorecen la progresión y los pacientes no progresados se protegieron de ellas con moléculas inhibitorias.

Sin embargo, en otros estudios se ha observado que en cultivo tienen una actividad inhibitoria frente a células tumorales de cáncer pancreático, o en *ex vivo* su capacidad de dirigir una actividad citotóxica a células tumorales de CPCNP. Aunque, aún están en una fase temprana de estudio y no se sabe con certeza los efectos de las moléculas de puntos de control inmune sobre ellas (LU et al., 2019; Yao et al., 2019)

Por último, las limitaciones de este estudio fueron las siguientes:

- Un período relativamente corto de seguimiento.
- Falta de línea control para la determinación de biomarcadores de tipo predictivo.

## Conclusiones:

En resumen, las conclusiones del estudio son:

- Las Mo-MDSCs y la presencia de LAG en linfocitos T CD8+ PD1- basales muestran relación con los pacientes progresados, por lo que el estudio de sus mecanismos podría ayudar al desarrollo de nuevas terapias dirigidas y el establecimiento de nuevos biomarcadores.
- Las diferencias postratamiento en las poblaciones de linfocitos T CD4+ reguladores podría ayudar a desvelar alguno de los mecanismos de progresión tumoral.
- El estudio de los mecanismos y efectos de los ICI en cada uno de los grupos celulares podría revelar nuevos mecanismos e incluso biomarcadores.

## Bibliografía

- American Cancer Society. (2021). *Cancer Facts & Figures 2021*. Atlanta: American Cancer Society.
- Andrews, L. P., Marciscano, A. E., Drake, C. G., & Vignali, D. A. A. (2017). LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. *Immunological Reviews*, 276(1), 80–96. <https://doi.org/10.1111/imr.12519>
- Arroyo Hornero, R., Betts, G. J., Sawitzki, B., Vogt, K., Harden, P. N., & Wood, K. J. (2017). CD45RA Distinguishes CD4+CD25+CD127–/low TSDR Demethylated Regulatory T Cell Subpopulations With Differential Stability and Susceptibility to Tacrolimus-Mediated Inhibition of Suppression. *Transplantation*, 101(2), 302–309. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001278>
- Calvo, V., Sierra-rodero, B., Cruz-bermúdez, A., & Provencio, M. (2020). Role of immunotherapy in stage IIIA non-small cell lung cancer : a narrative review. *Current Challenges in Thoracic Surgery*, 0(2), 1–17. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21037/ccts-20-82>
- Crinò, L., Weder, W., van Meerbeeck, J., & Felip, E. (2010). Early stage and locally advanced (non-metastatic) non-small-cell lung cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 21(SUPPL. 5). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq207>
- Detterbeck, F. C. (2018). The eighth edition TNM stage classification for lung cancer: What does it mean on main street? *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 155(1), 356–359. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2017.08.138>
- Detterbeck, F. C., Boffa, D. J., Kim, A. W., & Tanoue, L. T. (2017). The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. *Chest*, 151(1), 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.10.010>
- Duma, N., Santana-Davila, R., & Molina, J. R. (2019). Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 94(8), 1623–1640. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.013>
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3(11), 991–998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
- European Medicines Agency - EMA. (2015). Ficha técnica o resumen de las características del producto. Pembrolizumab. *Agencia Europea de Medicamentos*, 1–33. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zerbaxa-epar-product-information\\_es.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zerbaxa-epar-product-information_es.pdf)

- Gabrilovich, D. I. (2017). Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunology Research*, 5(1), 3–8. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0297>
- Garon, E. B., Rizvi, N. A., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A. S., Eder, J. P., Patnaik, A., Aggarwal, C., Gubens, M., Horn, L., Carcereny, E., Ahn, M.-J., Felip, E., Lee, J.-S., Hellmann, M. D., Hamid, O., Goldman, J. W., Soria, J.-C., Dolled-Filhart, M., ... Gandhi, L. (2015). Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 372(21), 2018–2028. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1501824>
- Gibney, G. T., Weiner, L. M., & Atkins, M. B. (2016). Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *The Lancet Oncology*, 17(12), e542–e551. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30406-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30406-5)
- Golubovskaya, V., & Wu, L. (2016). Different subsets of T cells, memory, effector functions, and CAR-T immunotherapy. *Cancers*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/cancers8030036>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hernandez, C., Arasanz, H., Chocarro, L., Bocanegra, A., Zuazo, M., Fernandez-Hinojal, G., Blanco, E., Vera, R., Escors, D., & Kochan, G. (2020). Systemic Blood Immune Cell Populations as Biomarkers for the Outcome of Immune Checkpoint Inhibitor Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2411. <https://doi.org/10.3390/ijms21072411>
- Hoechst, B., Ormandy, L. A., Ballmaier, M., Lehner, F., Krüger, C., Manns, M. P., Greten, T. F., & Korangy, F. (2008). A New Population of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Hepatocellular Carcinoma Patients Induces CD4+CD25+Foxp3+ T Cells. *Gastroenterology*, 135(1), 234–243. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.020>
- Hong, B., Heuvel, A. P. J. Van Den, Prabhu, V. V, Zhang, S., & El-deiry, W. S. (2014). *Targeting Tumor Suppressor p53 for Cancer Therapy: Strategies, Challenges and Opportunities*. 80–89.
- Hoy, H., Lynch, T., & Beck, M. (2019). Surgical Treatment of Lung Cancer. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 31(3), 303–313. <https://doi.org/10.1016/j.cnc.2019.05.002>
- Law, A. M. K., Valdes-Mora, F., & Gallego-Ortega, D. (2020). Myeloid-Derived Suppressor Cells as a Therapeutic Target for Cancer. *Cells*, 9(3), 561. <https://doi.org/10.3390/cells9030561>
- LU, Y., HU, P., ZHOU, H., YANG, Z., SUN, Y., HOFFMAN, R. M., & CHEN, J. (2019). Double-negative T Cells Inhibit Proliferation and Invasion of Human Pancreatic Cancer

Cells in Co-culture. *Anticancer Research*, 39(11), 5911–5918.  
<https://doi.org/10.21873/anticanres.13795>

Martens, A., Wistuba-Hamprecht, K., Yuan, J., Postow, M. A., Wong, P., Capone, M., Madonna, G., Khammari, A., Schilling, B., Sucker, A., Schadendorf, D., Martus, P., Dreno, B., Ascierto, P. A., Wolchok, J. D., Pawelec, G., Garbe, C., & Weide, B. (2016). Increases in Absolute Lymphocytes and Circulating CD4 + and CD8 + T Cells Are Associated with Positive Clinical Outcome of Melanoma Patients Treated with Ipilimumab. *Clinical Cancer Research*, 22(19), 4848–4858. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0249>

National Cancer Institute. (n.d.). *SEER\*Explorer: An interactive website for SEER cancer statistics*. <https://seer.cancer.gov/explorer/>

Nixon, A. B., Schalper, K. A., Jacobs, I., Potluri, S., Wang, I. M., & Fleener, C. (2019). Peripheral immune-based biomarkers in cancer immunotherapy: can we realize their predictive potential? *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7(1), 1–14.  
<https://doi.org/10.1186/s40425-019-0799-2>

O'Donnell, J. S., Teng, M. W. L., & Smyth, M. J. (2019). Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(3), 151–167. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0142-8>

Postmus, P. E., Kerr, K. M., Oudkerk, M., Senan, S., Waller, D. A., Vansteenkiste, J., Escriu, C., & Peters, S. (2017). Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 28(Supplement 4), iv1–iv21. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx222>

Provencio, M., Nadal, E., Insa, A., García-Campelo, M. R., Casal-Rubio, J., Dómine, M., Majem, M., Rodríguez-Abreu, D., Martínez-Martí, A., De Castro Carpeño, J., Cobo, M., López Vivanco, G., Del Barco, E., Bernabé Caro, R., Viñolas, N., Barneto Aranda, I., Viteri, S., Pereira, E., Royuela, A., ... Cruz-Bermúdez, A. (2020). Neoadjuvant chemotherapy and nivolumab in resectable non-small-cell lung cancer (NADIM): an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 21(11), 1413–1422. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30453-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30453-8)

Rosenthal, R., Cadieux, E. L., Salgado, R., Bakir, M. Al, Moore, D. A., Hiley, C. T., Lund, T., Tanić, M., Reading, J. L., Joshi, K., Henry, J. Y., Ghorani, E., Wilson, G. A., Birkbak, N. J., Jamal-Hanjani, M., Veeriah, S., Szallasi, Z., Loi, S., Hellmann, M. D., ... Swanton, C. (2019). Neoantigen-directed immune escape in lung cancer evolution. *Nature*, 567(7749), 479–485. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1032-7>

Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>

- Togashi, Y., Shitara, K., & Nishikawa, H. (2019). Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(6), 356–371. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0175-7>
- Tokito, T., Azuma, K., Kawahara, A., Ishii, H., Yamada, K., Matsuo, N., Kinoshita, T., Mizukami, N., Ono, H., Kage, M., & Hoshino, T. (2016). Predictive relevance of PD-L1 expression combined with CD8+ TIL density in stage III non-small cell lung cancer patients receiving concurrent chemoradiotherapy. *European Journal of Cancer*, 55, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.11.020>
- Yao, J., Ly, D., Dervovic, D., Fang, L., Lee, J. B., Kang, H., Wang, Y.-H., Pham, N.-A., Pan, H., Tsao, M.-S., & Zhang, L. (2019). Human double negative T cells target lung cancer via ligand-dependent mechanisms that can be enhanced by IL-15. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0507-2>
- Yu, N., Li, X., Song, W., Li, D., Yu, D., Zeng, X., Li, M., Leng, X., & Li, X. (2012). CD4+CD25+CD127low/- T Cells: A More Specific Treg Population in Human Peripheral Blood. *Inflammation*, 35(6), 1773–1780. <https://doi.org/10.1007/s10753-012-9496-8>

## Anexos

### 1. Protocolo Extracción PBMCs:

**A) ROTULAR TUBOS:** En cada vial y criotubo hay que escribir: Nombre Ensayo / Tratamiento / Extracción (Basal, 1 año o Progresión) / Fecha de Procesado / PBMCs (criotubo) o Plasma (ependorf) / Número de células ( $\cdot 10^6$ , solo en PBMCs).

**B) PROCESADO INICIAL DE LA MUESTRA:** Obtención de plasma sin diluir:

- Centrifugar a 1490 rpm o 400g, 10 minutos, temperatura ambiente, aceleración y desaceleración 9; en el mismo tubo de EDTA.
- Recoger plasma con pipeta Pasteur en un Falcon de 15 ml. Limpiar restos celulares con centrifugación: 1600 rpm o 500g, 10 minutos, temperatura ambiente, aceleración y desaceleración 9. Alicuotar en viales (aproximadamente 1'5 ml) y congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- Reconstituir la sangre: Añadir sobre los restos de sangre (pellet o masa roja) el mismo volumen de RPMI 1640 que hemos retirado de plasma. Añadir el posible pellet de limpiar el plasma.

**C) REALIZACIÓN DE FICOLL CON LYMPHOPREP:**

- En un Falcon de 50ml, añadir igual volumen de RPMI 1640 que de sangre total o reconstituida (sangre + RPMI equivalente al plasma). En otro Falcon de 50ml, añadir 1/3 del volumen anterior de Ficoll.
- Con pipeta serológica recoger la sangre diluida 1:1 en RPMI y echarla lentamente por la pared al otro Falcon que contiene Ficoll.  
**Δ Evitar que ambas fases se mezclen**, velocidad del Pipetus baja (L), inclinar el tubo  $45^{\circ}$ , deslizar la sangre por la pared, etc.
- Centrifugar a 1200rpm o 270g, 25 minutos, temperatura ambiente, aceleración 9 y desaceleración 0 (duración aproximada 30 minutos).
- Recoger en un Falcon de 15ml el anillo de PBMCs con pipeta Pasteur procurando evitar recoger mucho Ficoll.
- Lavado: Completar con RPMI hasta 15mL aprox. Centrifugar a 1600 rpm o 406g durante 10 minutos (temperatura ambiente, aceleración y desaceleración 9). Desechar el sobrenadante (RPMI) y resuspender el pellet en otros 10ml de RPMI.

**D) CONTAJE DE PBMCs Y CONGELACION:**

- Se toman 10uL de muestra y se diluyen con 10 uL de Trypanblue en un pocillo de p96. Mezclar bien y coger 10uL y añadirlos a la cámara de Neubauer (dilución  $\frac{1}{2}$ ).  
**Δ Si se cuenta en 1 cuadrante menos de 30 cls y más de 100 células, sería un error de conteo.** Si se da el caso en el que se cuentan más de 100 células en el primer cuadrante, realizar una dilución  $\frac{1}{4}$  (es decir, 10ul muestra+ 30ul Trypanblue).
- Contar mínimo 2 cuadrantes en diagonal. Calcular cantidad total de células.

$$= \frac{\text{Cantidad Total de Células}}{\text{Número Cuadrantes Contados}} \times 10^4 \times \text{Factor Dilución (2)} \times \text{Volumen total (10ml)}$$

- Congelación: Centrifugar el Falcon de 15ml con las PBMCs resuspendidas a 1600 rpm o 406g durante 10 minutos (temperatura ambiente, aceleración y desaceleración 9).
- Calcular el número de alícuotas: Dividir el número total de células entre la cantidad de células por alícuota). Las alícuotas deben tener como mínimo unos 4-5 millones de células. Lo normal es obtener 3 o 4 alícuotas.

- Cada alícuota necesita 1 ml de medio de congelación\*, por lo tanto, resuspender el pellet en X ml de medio de congelación (X igual al número de criotubos calculados) y alicuotar en los criotubos.

**Δ EN HIELO.**

\*Medio de Congelación:

- 25 ml FBS
- 20 ml RPMI 1640
- 5 ml DMSO

## 2. Protocolo Citometría de Flujo:

### 1.Preparación:

- Sacar PFA 1% de la nevera y meter en un cajón ( $T^{amb}$  y en oscuridad) y preparar dos cajas con hielo (una para trabajar y otra para las incubaciones).
  - Preparar FACS en caso de ser necesario (5% FBS + 95% PBS).
    - En un Falcon de 50 ml  $\rightarrow$  2'5 ml FBS + 47'5 ml PBS.
  - Rotular tubos eppendorf:
    - (4 paneles + Blank) x muestra.
    - Mix FcR Blocking + Violeta.
    - Mix de Acs x 4 paneles.
  - Rotular tubos Falcon de 15 ml:
    - 1 x muestra.
  - Añadir FACS a los tubos Falcon:
    - $\approx$ 1ml de células + 3'5ml FACS = 4'5 ml (1 ml x panel y el sobrante para Blank).
- Δ A partir de este punto, apagar las luces de la cabina porque el violeta y los anticuerpos pierden actividad con la luz.**
- Preparación de FcR Blocking + Violeta (x n'5) en hielo  $\rightarrow$  n = n° eppendorf (5 x muestra).
    - 95  $\mu$ l PBS x n'5
    - 5  $\mu$ l FcR Blocking x n'5
    - 0'05  $\mu$ l Violeta x n'5
  - Guardar en la nevera hasta su uso ( $\approx$ 4°C y oscuridad).

### 2.Descongelación de las células:

- Tras recoger los criotubos del nitrógeno, descongelación rápida en baño (agua caliente en vaso de precipitados).
- Δ Actuar con rapidez porque el DMSO en el que están las células es tóxico.**
- Añadir las células al Falcon de 15ml correspondiente con pipeta Pasteur. Homogenizar y repartir 1 ml a cada panel (y el sobrante al blanco).
  - Lavado  $\rightarrow$  Centrifugar a 2000 rpm durante 5 min.
    - Δ Comprobar que está seleccionado rpm y no g en la centrífuga.
  - Al terminar comprobar si hay pellet y decantar para retirar el sobrenadante.

### 3.FcR Blocking + Violeta:

- Añadir 100  $\mu$ l del mix FcR Blocking + Violeta a cada tubo, resuspendiendo con la misma pipeta para despegar el pellet.
- Incubar durante 30 min a 4°C en oscuridad (en la nevera dentro de la caja de hielo).
- Preparar mix de Anticuerpos durante la incubación. n = n° de muestras.
  - P1 – Panel de linfocitos T CD4+:
    - PBS – 50  $\mu$ l x n
    - CD3-PerCP (1/200) – 0'25  $\mu$ l x n
    - CD4-Viogreen (1/100) – 0'5  $\mu$ l x n
    - CD25-PE-Cy7 (1/25) – 2  $\mu$ l x n
    - CD127-PE (1/200) – 0'25 x n
    - CD45RA-APC-Vio770 (1/200) – 0'25 x n
    - CD45RO-FITC (1/100) – 0'5  $\mu$ l x n
  - P2 – Panel de Linfocitos T CD8+:
    - PBS – 50  $\mu$ l x n
    - CD3-PerCP (1/200) – 0'25  $\mu$ l x n
    - CD8-Viogreen (1/50) – 1  $\mu$ l x n
    - CD62L-PE (1/50) – 1  $\mu$ l x n
    - CD197/CCR7-PE-Cy7 (1/50) – 1  $\mu$ l x n
    - CD45RA-APC-Vio770 (1/200) – 0'25 x n
    - CD45RO-FITC (1/100) – 0'5  $\mu$ l x n

- P3 – Panel Linfocitos T Exhausted:
  - PBS – 50  $\mu$ l x n
  - CD3-PerCP (1/200) – 0'25  $\mu$ l x n
  - CD4-Viogreen (1/100) – 0'5  $\mu$ l x n
  - CD8-APC-Cy7 (1/100) – 0'5  $\mu$ l x n
  - CD28-PE (1/100) – 0'5  $\mu$ l x n
  - LAG3/CD223-APC (1/50) – 1  $\mu$ l x n
  - PD1/CD279-PE-Cy7 (1/100) – 0'5 x n
  - PDL1/CD274-FITC (1/25) – 2  $\mu$ l x n
- P4 – Panel MDSCs (Células Supresoras Derivadas de Mieloides):
  - PBS – 50  $\mu$ l x n
  - CD14-APC (1/200) – 0'25  $\mu$ l x n
  - CD11b-Viogreen (1/50) – 1  $\mu$ l x n
  - CD163-APC-Cy7 (1/100) – 0'5  $\mu$ l x n
  - HLA-DR-PE (1/100) – 0'5  $\mu$ l x n
  - CD33-PerCP (1/100) – 0'5  $\mu$ l x n
  - PD1/CD279-PE-Cy7 (1/100) – 0'5 x n
  - PDL1/CD274-FITC (1/25) – 2  $\mu$ l x n

**▲ En caso de no terminar a tiempo los mixes, lavar las células antes de seguir para que no estén tiempo de más incubando con el FcR Blocking y el Violeta.**

- Lavado → Añadir 300  $\mu$ l de PBS a cada tubo y centrifugar a 2000 rpm durante 5 min.
- Comprobar el pellet y decantar para retirar el sobrenadante.

#### 4. Tinción Anticuerpos:

- Añadir 50  $\mu$ l del mix correspondiente a cada panel y PBS a los tubos Blank, resuspender con la pipeta para despegar el pellet.
- Incubar durante 30 min a 4°C en oscuridad (en la nevera dentro de la caja de hielo).
- Lavado → Añadir 400  $\mu$ l de PBS a cada tubo y centrifugar a 2000 rpm durante 5 min.
- Comprobar el pellet y decantar para retirar el sobrenadante.

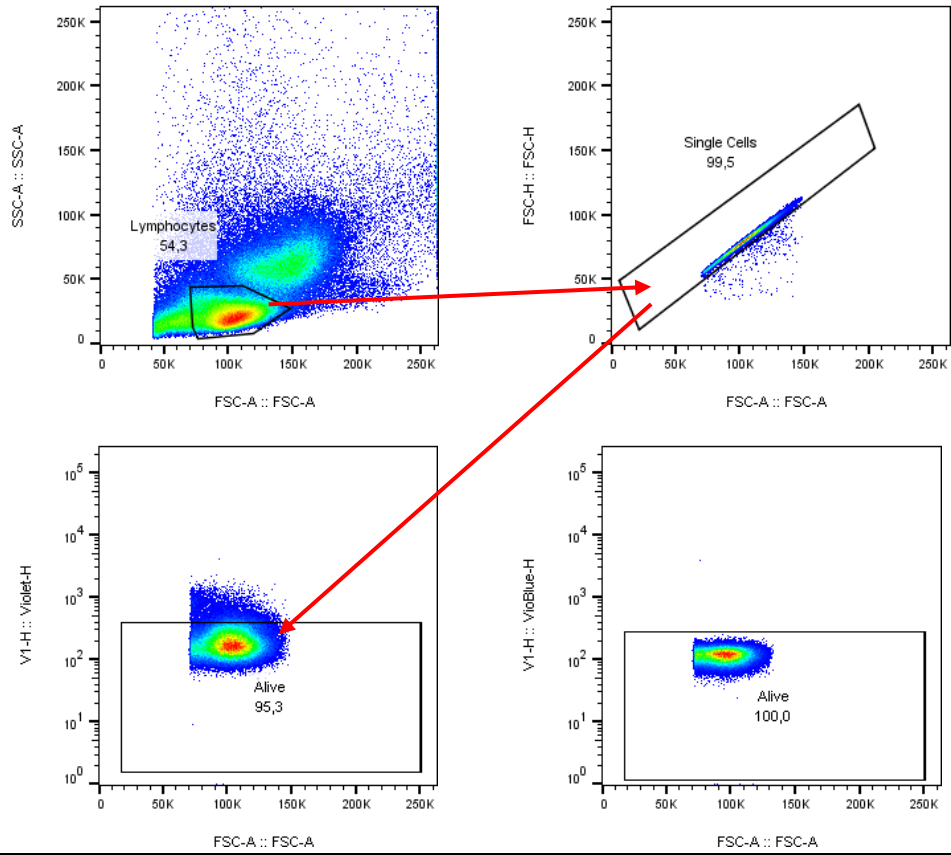
#### 5. Fijación con PFA:

- Añadir 200  $\mu$ l de PBS+PFA 1% a cada tubo, resuspendiendo con la pipeta para despegar la pipeta.
- Incubar durante 15 min a T<sup>amb</sup> en oscuridad (en un cajón).
- Lavado → Añadir 200  $\mu$ l de PBS a cada tubo y centrifugar a 2000 rpm durante 5 min.
- Resuspender en 300  $\mu$ l de PBS → **Citómetro**.

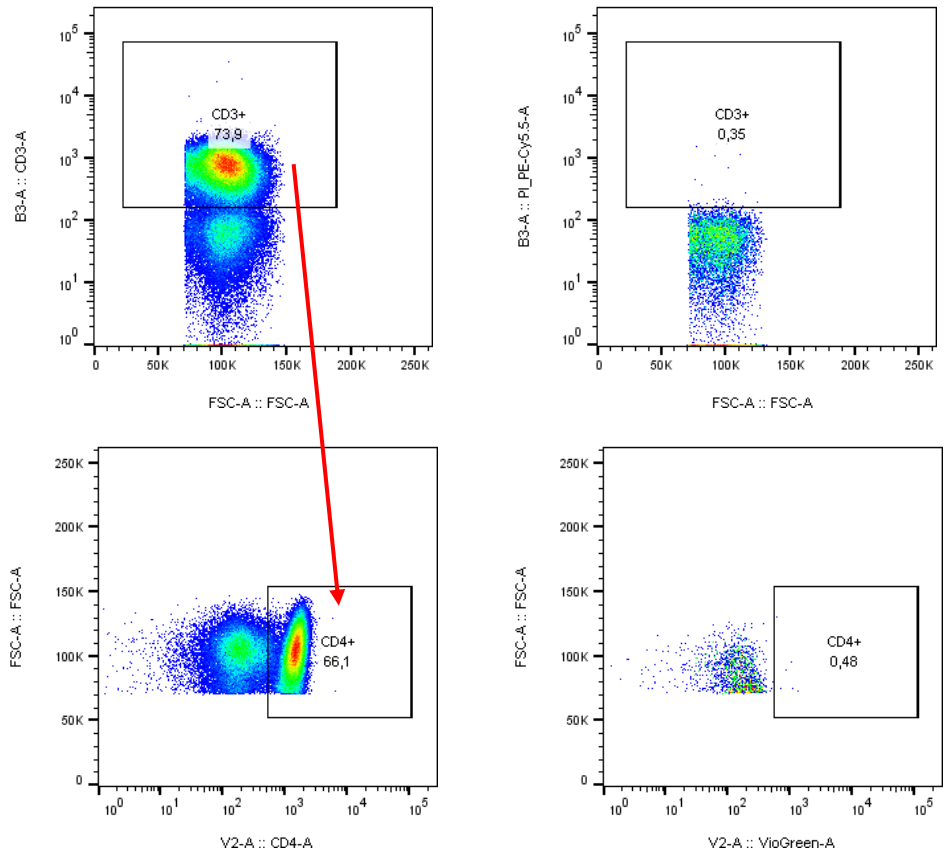
**▲ No dejar que pase mucho tiempo entre la resuspensión y el pase con el citómetro (hacerlo justo antes). Las células precipitan al fondo en muy poco tiempo.**

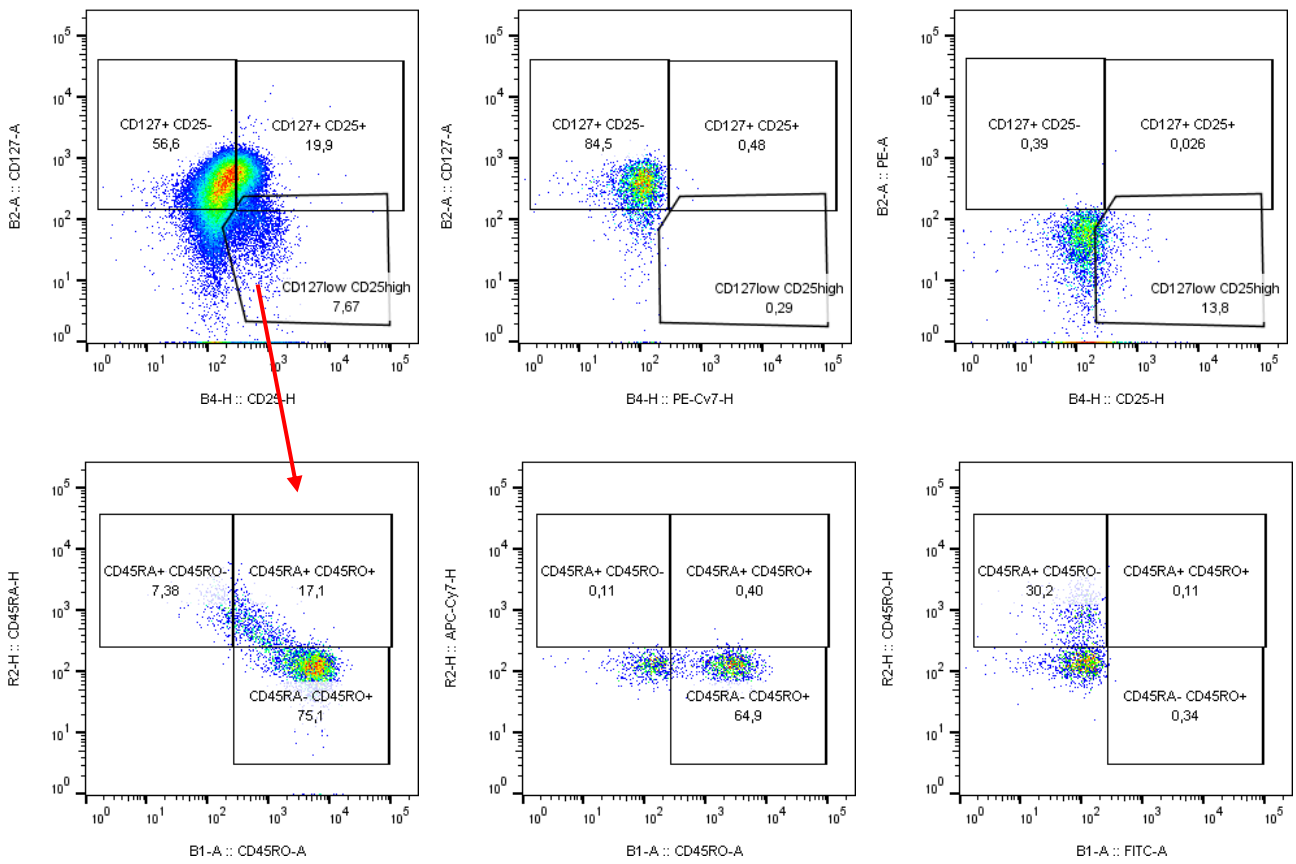
### 3. Estrategia de Análisis Citometría de Flujo:

A

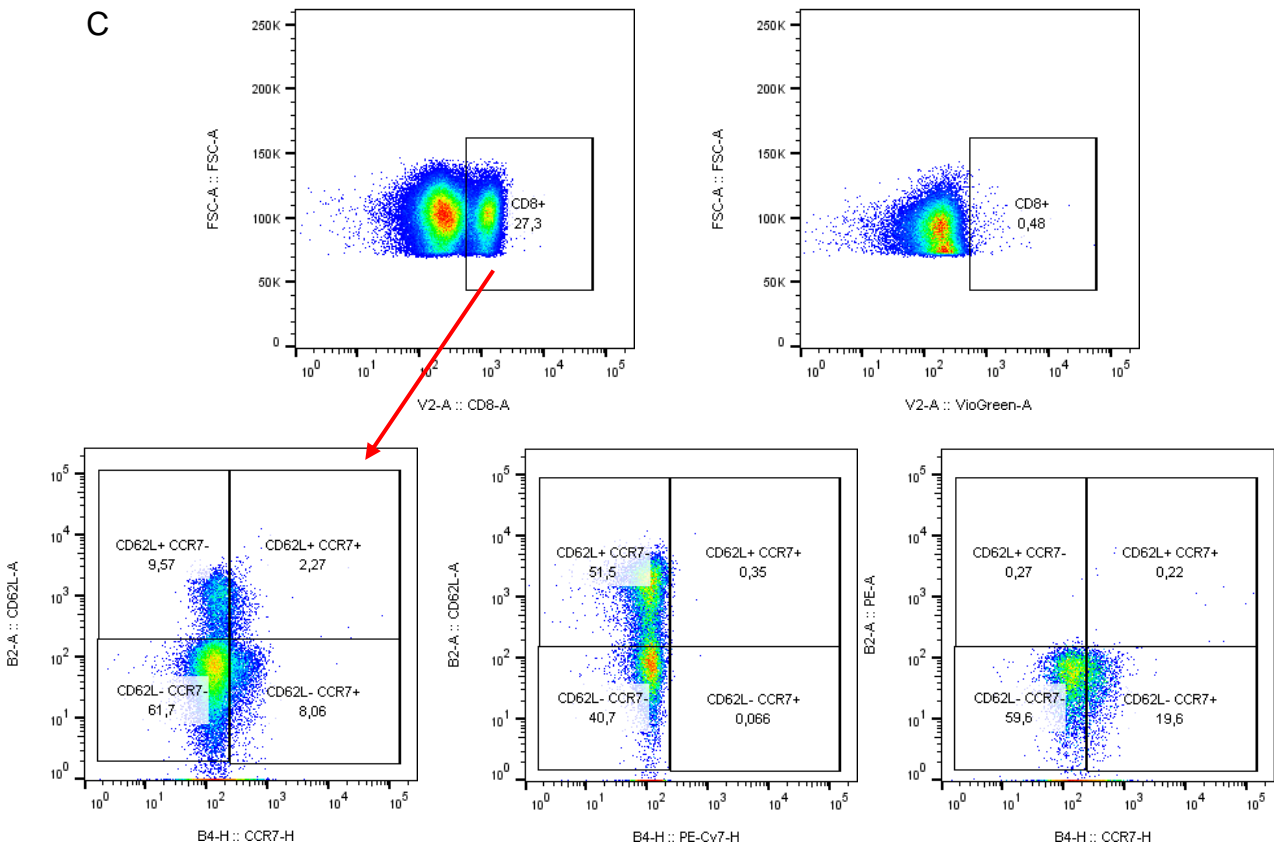


B

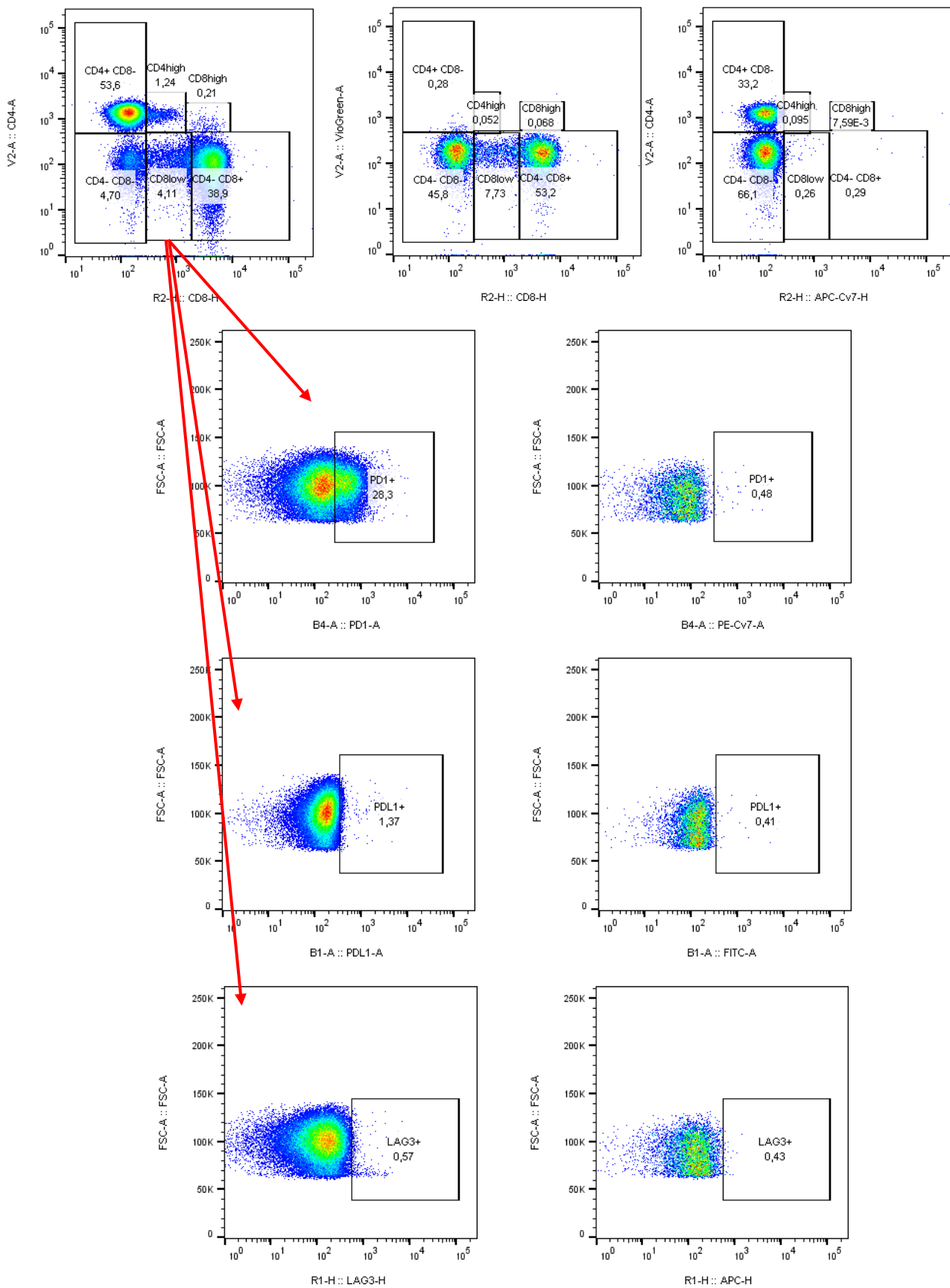


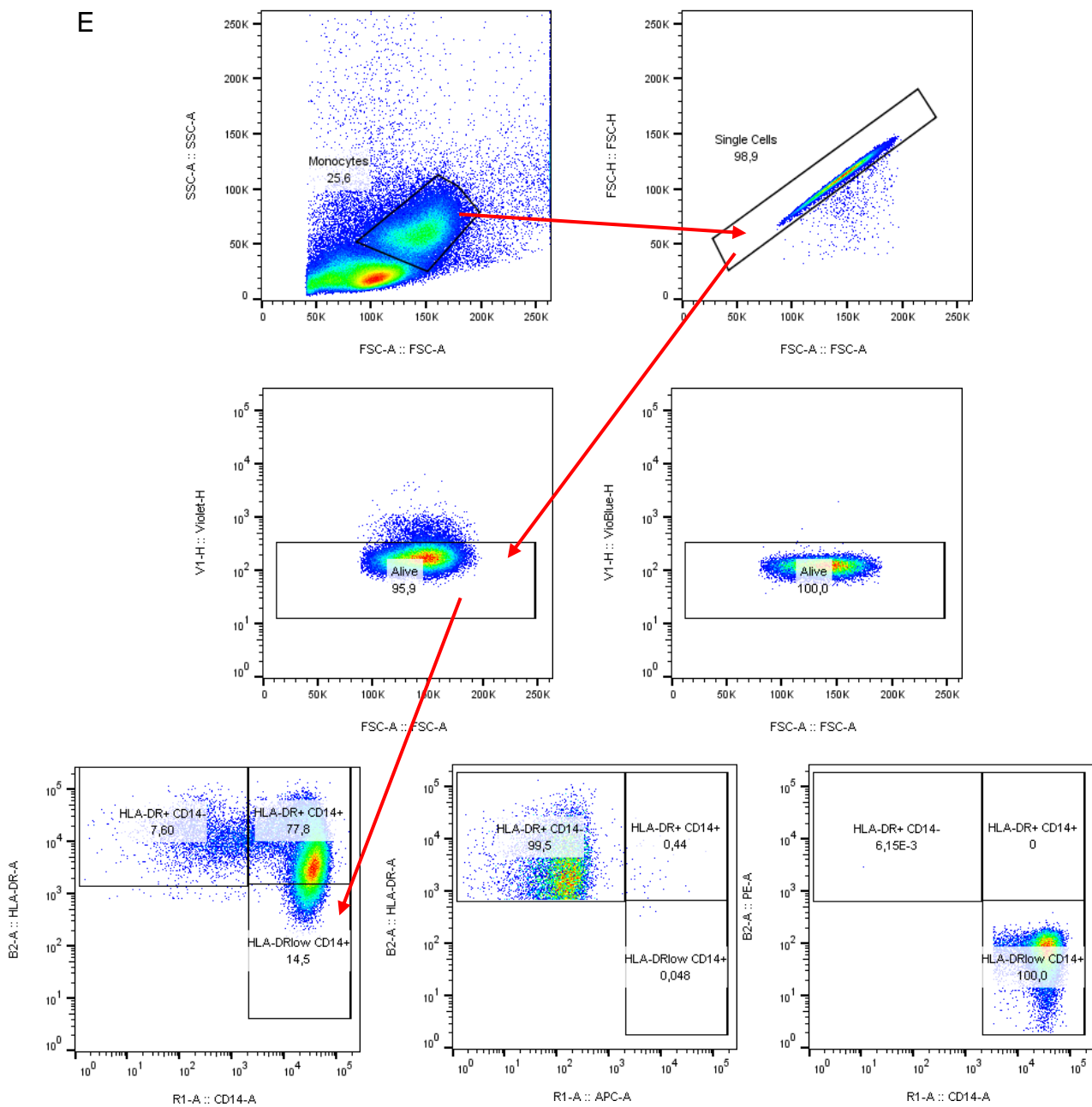


**C**



D





**Figura Suplementaria 1. Estrategia de análisis de los cuatro paneles de estudio. (A)** Estrategia inicial común para los paneles enfocados a las poblaciones linfocitarias (1, 2 y 3). (B) Estrategia de análisis para los linfocitos T CD4+. (C) Estrategia de análisis para los linfocitos T CD8+ (D) Estrategia de análisis para los linfocitos T *exhausted*. (E) Estrategia de análisis para las células mieloides.