



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA
CURSO DE ESPECIALIDAD EN ONCOLOGÍA MÉDICA**

**EXPRESIÓN DE PD1/PD-L1 EN SUBPOBLACIONES
DE SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CON
CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO
PEQUEÑAS AVANZADO, SU IMPLICACIÓN
PRONÓSTICA Y COMO BLANCO TERAPÉUTICO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
SUBESPECIALISTA EN ONCOLOGÍA MÉDICA
PRESENTA:**

**DRA. CONNIE ZURATZI DENEKEN
HERNÁNDEZ**

**DR. OSCAR GERARDO ARRIETA RODRÍGUEZ
TUTOR PRINCIPAL DE TESIS**



MÉXICO D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**EXPRESIÓN DE PD1/PD-L1 EN SUBPOBLACIONES DE SANGRE
PERIFÉRICA EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS
NO PEQUEÑAS AVANZADO, SU IMPLICACIÓN PRONÓSTICA Y COMO
BLANCO TERAPÉUTICO.**

Dra. Connie Zuratzi Deneken Hernández

Vo.Bo.

Dr. Oscar Gerardo Arrieta Rodríguez

Asesor de Tesis

Vo.Bo.

Dra. Sylvia Verónica Villavicencio Valencia

Subdirección de Educación Médica

ÍNDICE

Resumen	página 4
Introducción	
○ Epidemiología	página 6
○ Patología	página 6
○ Activación del Sistema Inmune	página 7
○ Puntos del control inmunológico	página 8
○ B7-H1/PD-L1 y B7-DC/PD-L2,	página 9
○ Inmunotolerancia y Estado de PD-1/B7-H1 en el cáncer	página 12
○ Expresión de PD-1 y PD-L1 en el ambiente tumoral y células sanguíneas periféricas	página 13
○ Posibilidades de la inmunoterapia en el cancer,	página 13
○ Anticuerpos monoclonales contra PD-1 y B7H1	página 15
HIPÓTESIS DE TRABAJO	página 16
OBJETIVOS	página 17
DISEÑO DEL ESTUDIO	página 18
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	página 22
PROCESO DE OBTENCION DE MUESTRAS	página 24
RESULTADOS,	página 26
○ Tablas	página 28
DISCUSIÓN	página 34
BIBLIOGRAFÍA	página 35

RESUMEN

Justificación: En la actualidad, el sistema inmune es un blanco importante de estudio para el tratamiento del cáncer. Los hallazgos obtenidos en la inmunoterapia del melanoma^{1,2} han obligado a buscar su utilización en otras patologías, entre ellas el cáncer de pulmón. La evidencia reciente ha mostrado que tanto el co-receptor de muerte programada PD-1 de los linfocitos T, así como sus ligandos B7-H1/PD-L1, juegan un papel importante en mantener un ambiente de inmunosupresión a nivel tumoral, es decir, la vía PD1/PD-L1 es clave para la modulación de la activación e inactivación del sistema inmune.³ Diversos estudios han mostrado que la expresión de PD-L1 en tejido tumoral se correlaciona con un pronóstico desfavorable, sin embargo, existe poca información sobre su valor pronóstico en células de sangre periférica.

Pacientes y métodos: Se incluyeron pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón de células no pequeñas, histología adenocarcinoma, en estadio clínico IV de la clínica de cáncer de pulmón del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) en colaboración con el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

Se realizó un estudio observacional con muestreo transversal para evaluar si la sobre-expresión del receptor PD1 en alguna o algunas poblaciones celulares de sangre periférica de los pacientes estudiados podía *representar* un biomarcador pronóstico potencial.

Resultados:

Los resultados del análisis bivariado en donde se compararon los parámetros de porcentaje e intensidad media de fluorescencia (IMF) totales antes y después del inicio del tratamiento con nivolumab y docetaxel se encontró con una diferencia estadísticamente significativa el descenso del porcentaje de PD-1 de 0.75 a 0.575 posterior al tratamiento con nivolumab, observándose un efecto contrario en los pacientes que recibieron docetaxel, ya que de 0.23 ascendió a 1.395 con $P = 0.000$

De igual manera, observamos que tanto el porcentaje de PD-L2 (en pacientes con nivolumab y docetaxel) como la IMF (sólo nivolumab) aumentaron de forma importante, con significancia estadística. Para nuestro conocimiento, es la primera vez que se estudia la presencia de dicho marcador y sus implicaciones pronósticas son inciertas; biológicamente podría deberse a la liberación de PD-L2 del tejido tumoral como parte de un mecanismo de evasión al sistema inmunológico.

Conclusiones: La información obtenida si bien proviene de una cohorte pequeña de pacientes, nos muestra que la expresión total en sangre periférica de PD-1 podría utilizarse como un biomarcador de respuesta al tratamiento con nivolumab.

INTRODUCCIÓN

Epidemiología

El cáncer de pulmón (CP) es la causa más frecuente de muerte por cáncer en hombres y la cuarta en mujeres en todo el mundo; en México representa la primera causa de muerte.⁴ (Ríos et al., 2007). En el año 2008, las muertes por CP fueron 6,697, superando las producidas por otros tumores; asimismo, se estima para el año 2010 más de 10 mil muertes por esta causa, lo que significa un incremento del 50% en tan sólo una década.⁵ (Ferlay et al., 2010). En pacientes con enfermedad metastásica, la supervivencia a 5 años en países desarrollados es <5%⁶

En el Instituto Nacional de Cancerología sólo 1.2% de los pacientes se detecta en etapas tempranas; de los 250 nuevos casos que se ven anualmente, cerca del 90% muere antes de los 18 meses⁷.

A pesar de los avances observados para el tratamiento del CP con las terapias blanco, la supervivencia máxima lograda en enfermedad metastásica es de 2 años. Por esta razón resulta importante desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.⁸

Patología

De acuerdo con las características histológicas y clínicas, el CP se divide en células pequeñas y no pequeñas. El grupo de carcinomas pulmonares de células no pequeñas (CPCNP) representa el 85% de todos los casos de cáncer pulmonar y se encuentra integrado a su vez por tres tipos histopatológicos principales: carcinoma de células grandes, carcinoma epidermoide y adenocarcinoma; siendo estos últimos los que representan 85% de todos los casos de CPCNP.^{7,9}

Cabe destacar la importancia de realizar un buen diagnóstico histopatológico, ya que de eso dependen tanto el tratamiento como el pronóstico. En la actualidad, es necesaria la realización de tinciones de inmunohistoquímica para determinar el tipo histológico. (Imagen 1).

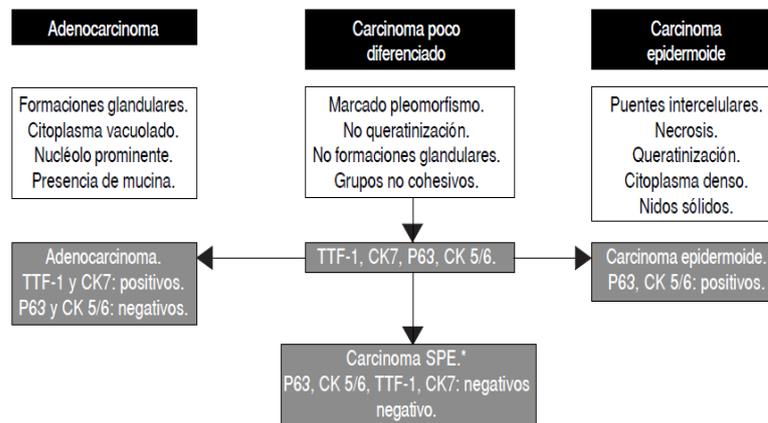


Figura 1

Características histopatológicas y de inmunohistoquímicas del cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Tomado del Consenso Nacional de Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer de Pulmón de Células no Pequeñas, 2013

En el 2011 se publicó la nueva clasificación para el adenocarcinoma pulmonar,¹⁰ debido a la mezcla heterogénea encontrada en el tejido tumoral. Los subtipos histológicos reconocidos actualmente dentro del carcinoma invasor son la forma lepidica, acinar, micropapilar, papilar y sólido. Existen otras variantes como el mucinoso (importante ya que reemplaza el término previo de bronquiolo alveolar mucinoso), coloide, fetal y entérico.

La importancia de esta nueva clasificación radica en la identificación de subtipos histológicos de peor pronóstico¹¹ así como su relación con el hallazgo de mutaciones de EGFR (alta incidencia en los subtipos micropapilar y lepidico).¹²

Con el desarrollo de las terapias blanco en los últimos 10 años, se recomienda la realización de la detección de la presencia de mutaciones, principalmente en la histología de adenocarcinoma.¹³ Las mutaciones para

las cuales existe terapia dirigida incluyen aquellas presentes en el dominio de cinasa de tirosina del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), las mutaciones del gen de KRAS y el gen de fusión EML4 y la cinasa del linfoma anaplásico (ALK).¹⁴

Recientemente, se han buscado nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento del cáncer de pulmón, entre ellas, la inmunoterapia. La inmunoterapia consiste en la estimulación del sistema inmune para disminuir la anergia inducida por las células tumorales.¹⁵ Existe, por lo tanto, una absoluta necesidad de reactivar al sistema inmune.¹⁶

Para entender el mecanismo de acción de estos nuevos medicamentos, es necesario primero comprender el sistema inmune, su activación y su regulación.

Activación del Sistema Inmune

El papel principal del sistema inmune consiste en discriminar lo propio de lo extraño y eliminar todo aquello que no sea parte del organismo.¹⁷ El término inmunovigilancia describe la situación en la que las respuestas inmunes se dirigen contra células infectadas por algún virus o bien, a identificar, detener el crecimiento y eliminar células tumorales.¹⁶

El mecanismo mediante el cual el sistema inmune reconoce y elimina las células tumorales se lleva a cabo mediante un proceso complejo, el cual incluye:

1. Reconocimiento inmunológico iniciado por las células presentadoras de antígeno (CPA), en el cual el antígeno es internalizado y procesado para ser expresado en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Esto desencadena la expresión de B7 y la migración de las CPA a los ganglios.
2. Presentación de antígeno a los linfocitos T, con interacción adicional de B7 y el CD28.

3. Interacción del linfocito T activado con la célula tumoral y su subsecuente lisis.

El desarrollo de una respuesta antígeno específica por parte de los linfocitos T es un evento complejo y sumamente regulado. Es importante destacar la necesidad de contar con señales inmunomoduladoras, es decir, es necesario tener no sólo señales coestimuladoras (por ejemplo, la coestimulación entre CD28 y B7) sino también coinhibitorias (interacción entre CTLA-4 y B7).¹⁸

Dichas señales coinhibitorias tienen como finalidad proteger al organismo del desarrollo de autoinmunidad, estas señales se conocen como puntos de control inmunológico que disminuyen la intensidad de la respuesta inmune.¹⁹

Puntos de control inmunológico

Existen dos receptores relacionados con funciones regulatorias de los linfocitos T activos y de algunas subpoblaciones de linfocitos T reguladores: CTLA-4 y PD-1.^{18,20}

El receptor CTLA-4 regula la amplitud de la activación temprana de los linfocitos T vírgenes y de memoria y actúa normalmente como un modulador de la señalización.²¹ Se expresa de forma constitutiva en los linfocitos T reguladores. Al unirse CTLA-4 con los ligandos B7-1 y B7-2, inhibe la interacción de estos con CD-28, molécula coestimuladora, resultando en la supresión de la respuesta por parte de los linfocitos T reguladores.¹⁸

En resumen, la señalización de CTLA-4 limita el inicio de la respuesta T celular a nivel ganglionar. (Imagen 2).

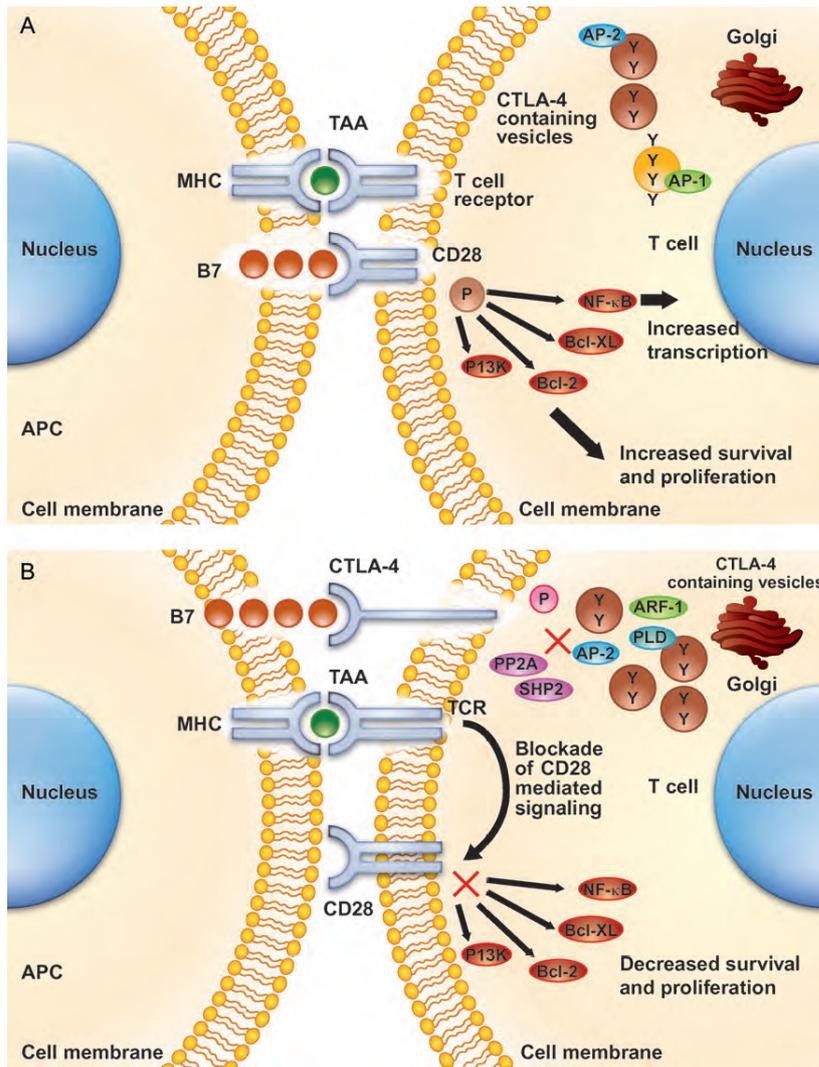


Figura 2

Mecanismo de Acción de CTLA-4

En reposo, CTLA-4 se encuentra almacenado en vesículas intracelulares (A) pero al activarse, es liberado y evita la unión de B7 con CD28, bloqueando la señalización intracelular que promueve la proliferación celular.

La importancia de CTLA-4 fue recientemente demostrada con la aprobación del ipilimumab para el tratamiento de melanoma metastático, observando que el bloqueo del CTLA-4 incrementaba en la supervivencia global, lo que no se había logrado con los tratamientos convencionales a base de quimioterapia.^{22,23}

De la misma forma, actualmente se encuentran en desarrollo estudios de la eficacia de ipilimumab en CPCNP.²⁴

B7-H1/PD-L1 y B7-DC/PD-L2

El receptor de muerte programada PD1 (PD, Programmed Death receptor por sus siglas en inglés) es un receptor transmembrana de muerte celular de la

familia de B7. Consta de una porción extracelular con un dominio variable tipo Ig y de una porción citoplasmática que consta de dos regiones tipo tirosina.¹⁸

Este receptor tiene como función regular de manera negativa la activación de linfocitos T y es crucial para mantener la inmunotolerancia, se expresa principalmente en linfocitos T activos, linfocitos B y monocitos.^{3,25}

A diferencia de CTLA-4, el papel principal del PD-1 es limitar la respuesta inflamatoria (Figura 3). Esta regulación inhibitoria de PD-1 es secundaria a la sobreexpresión de sus ligandos en respuesta a la liberación de citocinas como el interferón gamma durante la respuesta inflamatoria.²⁶

Los ligandos de PD-1, PD-L1 y PD-L2, tienen diferentes patrones de expresión, secundario a diferentes funciones en la regulación de la respuesta inmune.²⁷ PD-L1 se expresa a niveles altos en el corazón, timo y pulmón, además de células linfohematopoyéticas (incluyendo linfocitos T y B) y en células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas). En contraste, la expresión de PD-L2 se observa sólo en macrófagos y células dendríticas.²¹

Al unirse PD-L1 a su receptor se observa una disminución en la proliferación celular mediada por la activación de los linfocitos T así como en la producción de citocinas, regulando así la inmunotolerancia periférica. En contraste con tejidos normales, la expresión de PD-L1 es abundante en diversos tumores (uroteliales, ovario, mama, colon, páncreas, CPCNP) y puede aumentar con la estimulación de IFN-G.^{3,28}

Además de la unión del PD-L1 a su receptor, se ha descrito que también se une a B7.1 sugiriendo que existen vías de activación independientes de este ligando con otros receptores.

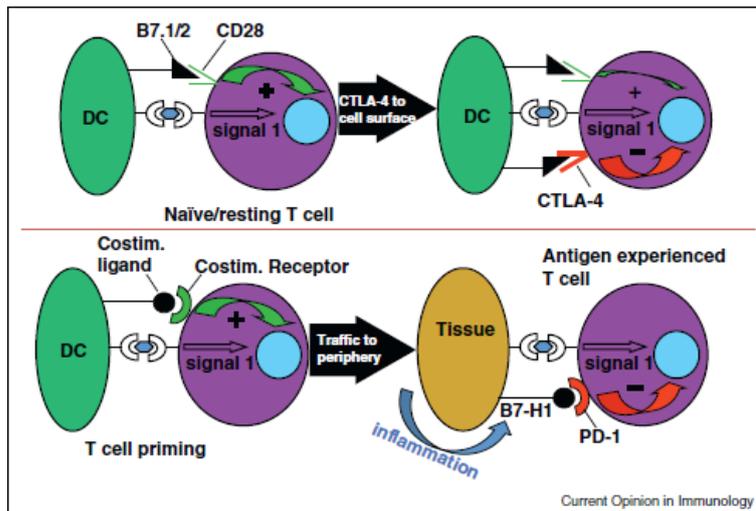


Figura 3

Diferencias entre CTLA-4 y PD-1

Mientras que CTLA-4 modula las fases tempranas de la activación de los linfocitos T, PD-1 funciona limitando la actividad de los linfocitos T durante la respuesta inflamatoria.

DC: célula dendrítica

Existen 4 mecanismos propuestos mediante los cuales PD-1 ejerce sus mecanismos inhibitorios:¹⁶

1. Inhibición mediada por el receptor de linfocitos T (TCR). La interacción de PD-L1 con PD-1 afecta de forma directa la vía señalización del TCR, disminuyendo la producción de IL-2 y la proliferación celular. (Figura 4).
2. Inhibición mediada por señal de paro. La interacción de PD-1 con PD-L1 incrementa la movilidad del linfocito T, evitando la formación de un apareamiento estable entre las CPA y los linfocitos T.
3. Inhibición mediada a través de moléculas adaptativas intracelulares.
4. Inhibición mediada a través de mecanismos inversos de las CPA. Mediante este mecanismo se induce la síntesis de IL-10, una citosina inmunosupresora.

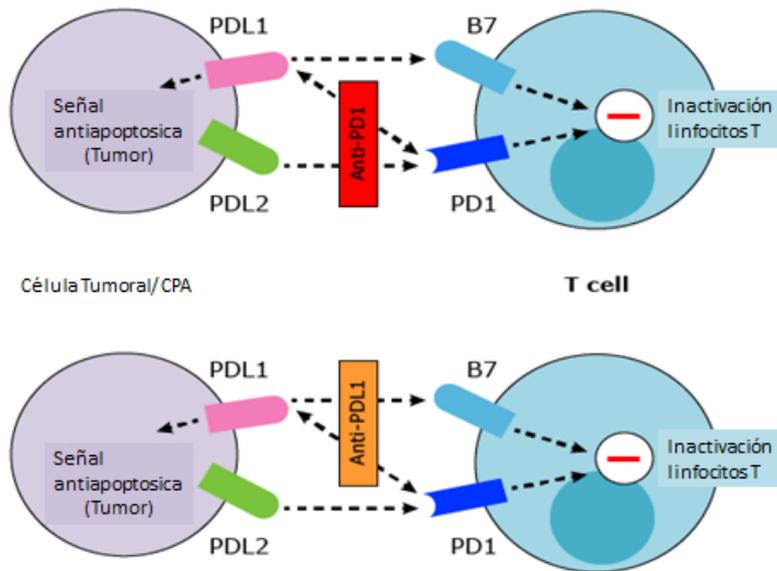


Figura 4

PD-1 y PD-L1

La inhibición de PD-1 ocurre de forma predominante a nivel tumoral. PD-1 es reconocido por PD-L1 desactivando los linfocitos T

Inmunotolerancia y Estado de PD-1/B7-H1 en el cáncer

En la actualidad se sabe que las células tumorales pueden evadir al sistema inmunológico mediante diversos mecanismos que involucran no sólo al sistema inmune adaptativo sino también al sistema inmune innato.²⁹ Dicha evasión es el primer paso necesario para el crecimiento exponencial de las células cancerígenas.

Dentro del microambiente tumoral se encuentra un infiltrado inflamatorio conformado por linfocitos T citotóxicos y linfocitos T reguladores. Su importancia en la actualidad radica en el hallazgo de que los tumores no son sólo capaces de evadir al sistema inmune, sino también son capaces de inducir la expresión de linfocitos T reguladores y contrarrestar así la actividad antitumoral de los linfocitos T efectores.²⁶

Asimismo, diversos estudios han demostrado que la manipulación por dicho microambiente de la vía molecular de B7-H1/PD-1 se asocia a la inhibición de la respuesta inmune contra el cáncer, permitiendo la progresión de la enfermedad y el desarrollo de metástasis.³⁰

Independientemente de la inducción de la expresión de B7-H, la presencia de PD-L1 en células cancerígenas reprime la expresión de E-cadherina y promueve la de factores de transcripción involucrados en la inducción de la transición epitelio-mesénquima, proceso relacionado con la evasión tumoral y el desarrollo de metástasis.

Esta vía es uno de los principales mecanismos de evasión inmunológica debido a que está involucrada en la regulación negativa de la respuesta inmune por el aumento en la expresión de B7-H1 (incluso pareciera ser factor de mal pronóstico).²⁶

Podemos concluir entonces que esta vía de señalización ofrece un amplio campo de investigación para mejorar la inmunidad antitumoral.

Expresión de PD-1 y PD-L1 en el ambiente tumoral y células sanguíneas periféricas

En un estudio realizado en China de manera retrospectiva se analizó por IHQ la expresión de PD-L1 en el microambiente tumoral de 120 tejidos y en 10 muestras de control.³¹ concluyendo que la expresión de dicho ligando correlacionaba de forma negativa en el pronóstico de los pacientes, hallando además una relación con el grado de diferenciación y estadio TNM avanzado. La información con la que disponemos sugiere también que la expresión al menos de PD-L1 mediante IHQ en el tejido tumoral puede predecir la respuesta clínica.

Sin embargo, existe muy poca información sobre la expresión de dichas moléculas en poblaciones celulares en sangre periférica así como su expresión posterior al tratamiento. Un estudio mostró una relación entre el nivel de PD-L1 soluble con el estadio TNM y por consecuencia en el pronóstico de los pacientes.³² En otro estudio sobre cáncer renal, se midió la expresión de PD-1 en sangre periférica de 90 pacientes, hallando también una correlación con el estadio clínico y con la disminución de la expresión de dicho receptor posterior al tratamiento (en este caso, quirúrgico).³³

Posibilidades de la inmunoterapia en el cáncer

La meta de la inmunoterapia en cáncer es el tratamiento de la enfermedad al inducir o aumentar la respuesta inmunológica³⁴. En un inicio, las investigaciones se basaban en los antígenos asociados al tumor (AAT), siendo poco exitoso. No fue hasta el descubrimiento de las vías moleculares y mecanismos de inmunotolerancia inducidos por los tumores que nuevamente se ha buscado recurrir a la manipulación inmunológica como posible herramienta terapéutica.

La inmunoterapia antineoplásica se ha clasificado en 4 categorías:

1. Inmunoterapia inespecífica, basada en la potenciación del sistema inmune con moduladores de la respuesta biológica (BCG).
2. Inmunoterapia pasiva, basada en el potencial terapéutico de anticuerpos dirigidos contra células tumorales, tanto como mediadores de la destrucción tumoral por sus propiedades efectoras, como vehiculizando distintos agentes tóxicos.
3. Inmunoterapia adoptiva, basada en la administración de linfocitos u otras células previamente extraídas del paciente, expandidas y/o activadas in vitro con citocinas (sipuleucel).
4. Inmunoterapia activa, basada en la administración de vacunas que contengan antígenos tumorales con objeto de provocar una respuesta inmune que destruya las células tumorales preexistentes o las que puedan generarse (ipilimumab, nivolumab).

Como ya se mencionó previamente, los puntos de control inmunológico destinados a suprimir respuestas inapropiadas son utilizadas por los tumores para evadir la respuesta inmune. Justamente en estos puntos es donde se ha enfocado el desarrollo de armas terapéuticas, incluyendo las vías de PD-1 y CTLA-4.¹⁶

El mecanismo mediante el cual bloqueo de CTLA-4 termina en la muerte celular no es del todo conocido. Sin embargo, se sabe que dicho bloqueo promueve la activación de los linfocitos T efectores y una inhibición concomitante de los linfocitos T reguladores.

El primer anticuerpo desarrollado para CTLA-4, el ipilimumab, se encuentra actualmente en fase III para CPCNP en conjunto con quimioterapia a base de paclitaxel y carboplatino. (ClinicalTrials Gov identifier NCT01285609).

El bloqueo de PD-1 o de sus ligandos igualmente ofrece un blanco terapéutico potencial para pacientes con cáncer; Topalian *et. al* han estudiado la seguridad y eficacia del nivolumab, anticuerpo monoclonal completamente humanizado dirigido contra el receptor de PD-1. (Figura 5)

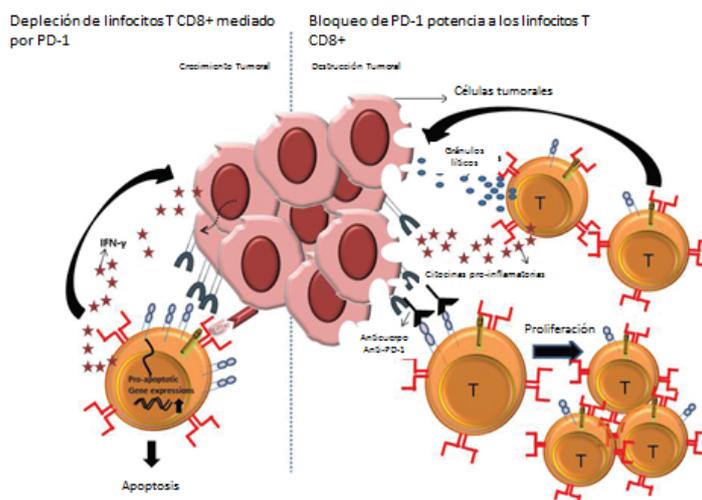


Figura 5

Depleción de linfocitos T

La inactivación y depleción de linfocitos T se logra con el bloqueo de PD-1, llevándolo a la apoptosis.

Anticuerpos monoclonales contra PD-1 y B7H1

En la actualidad la inmunoterapia con anticuerpos monoclonales ha adquirido gran importancia. En este momento existen varios fármacos en fase de investigación no sólo anti PD-1 y anti PD-L1, sino también anti CTLA-4. (Tabla 1)

TABLA 1: Anticuerpos y blancos terapéuticos

Anticuerpo	Blanco	Fase de desarrollo
Ipilimumab (BMS)	CTLA-4	Aprobado por la FDA
Tremelimumab (Pfizer)	CTLA-4	Fase III completado
Nivolumab/ BMS-936558	PD-1	Fase III en proceso
CT-011 (CureTech)	PD-1	Fase I
MK-3475 (Merck)	PD-1	Fase I
AMP-224 (Amplimmune)	PD-1	Fase I
BMS-936559 (BMS)	PD-L1	Fase I completado
MEDI4736 (MedImmune/AstraZeneca)	PD-L1	Fase I
MPDL3280A/ RG7446 (Genentech/Roche)	PD-L1	Fase I

Nivolumab

En un estudio fase I/II incluyó 107 pacientes con melanoma previamente ya tratados y a quienes se les inició nivolumab³⁵ (MDX-1106). Se observó respuestas objetivas de hasta 31%.

De forma interesante, en los pacientes con remisión y estabilización de la enfermedad la respuesta se mantuvo incluso después de la suspensión del tratamiento. Además de la actividad mostrada en melanoma (con una tasa de respuesta de hasta 28%), este medicamento obtuvo respuestas parciales y completas duraderas en pacientes con cáncer renal (27%) y cáncer de pulmón (18%). Por lo anterior, en este momento se encuentra en realización el estudio Check-Mate-012 para evaluar la eficacia y seguridad del nivolumab en cáncer de pulmón CNP.

En cuanto a los efectos adversos, se documentó linfopenia (25.6%), fatiga (15.4%) y mialgias (15.4%). Los eventos inmunes se observaron en 5.2% e incluyeron colitis inflamatoria e hipotiroidismo.³⁶

Lambrolizumab (MK-3475)

La molécula MK-3475 es un anticuerpo humanizado anti-PD-1. De igual forma, en el estudio fase I de lambrolizumab³⁷ con 135 pacientes de melanoma se obtuvo una tasa de respuesta de 37% con los criterios de la OMS de respuesta inmune y 38% por RECIST. La tasa de efectos adversos observados fue de 79%, pero sólo 13% fueron grado 3-4.

De manera alternativa, el bloqueo de PD-L1 ha recibido atención por parte de la industria farmacéutica. Como se observa en la tabla, los últimos trabajos que se han publicado corresponden a trabajos en fase I anti PD-L1 (tales como MPDL3280A, BMS-936559, EDI4736).³⁸

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Hipótesis nula

La sobre-expresión PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón en estadio clínico IV es un biomarcador tanto pronóstico.

Hipótesis Alternativa

La sobre-expresión PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón en estadio clínico IV no resulta útil como biomarcador pronóstico.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la expresión de PD-1 y sus ligandos PD-L1 y PD-L2 en subpoblaciones celulares de sangre periférica como posible biomarcador pronóstico/predictivo en cáncer de pulmón de células no pequeñas, asociando la expresión con las características clínico-patológicas de los pacientes estudiados.

Objetivos Específicos

1. Evaluar la expresión de PD-1 en las subpoblaciones de células T (CD3+), B (CD19+CD20+), NK (CD16+CD56+) NKT (CD3+CD16+CD56+), precursores de células dendríticas, monocitos (CD14+), células tumorales circulantes (CD34-/CD45-/e-caderina-/EPCAM+/citoqueratina 18+/citoqueratina 19+) y células endoteliales circulantes (CD34+) de sangre periférica en pacientes con (CPCNP) libres de tratamiento por citometría de flujo.
2. Evaluar la expresión de los ligandos PD-L1 y PD-L2 en las mismas subpoblaciones celulares por citometría de flujo.
3. Comparar la respuesta y sobrevida libre de progresión en pacientes con CPCNP tratados con nivolumab, independientemente de los niveles de expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células circulantes.

DISEÑO DEL ESTUDIO

El presente es un estudio de cohorte prospectivo que incluyó a pacientes con CPCNP en estadio IV de la clínica de cáncer de pulmón del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) en colaboración con el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

Se realizó un estudio observacional con muestreo transversal para evaluar si la sobre- expresión del receptor PD1 en alguna o algunas poblaciones celulares de sangre periférica de los pacientes estudiados representaba un biomarcador pronóstico potencial.

Grupos de pacientes

Criterios de inclusión.

1. Pacientes que estén de acuerdo en ser parte de este trabajo, firmando el consentimiento informado.
2. Diagnóstico de CPCNP avanzado, con histología o citología documentado.
3. Buen estado ECOG de 0-2 y presentar evidencia de enfermedad medible.

Criterios de exclusión.

1. Se excluirán aquellos pacientes con un tipo histológico diferente al adenocarcinoma.
2. Sujetos con inflamaciones agudas e infecciones no controladas.

Criterios de eliminación.

1. Retiro del consentimiento informado

Número de pacientes y tamaño de muestra.

Se realizó un estudio piloto para estimar el tamaño de muestra estadísticamente adecuado para evaluar las diferencias entre controles y pacientes.

Se incluyó a pacientes con CPCNP de estirpe histológico de adenocarcinoma en estadio IV de la clínica de cáncer de pulmón del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) en colaboración con el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

Debido a que no existen reportes de la expresión total de PD-1 y de sus ligandos, en las subpoblaciones específicas con CPCNP y en base a estudios similares en otros tipos de cáncer donde el tamaño de muestra oscila entre los 50 y 150 pacientes en los que se observan diferencias significativas, se estimó que el análisis en 300 pacientes con CPCNP y en 50 voluntarios como controles negativos, nos permitiría evaluar las diferencias en la expresión de PD-1, así como en PD-L1.

Metodología experimental.

Obtención de células mononucleares.

Previo consentimiento informado y antes de recibir algún tratamiento, se obtuvo muestra de sangre periférica de 15 ml de cada sujeto incluido en el estudio, (pacientes y controles).

Se emplearon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los diferentes grupos de sujetos separadas por un gradiente de centrifugación (Polymorphprep, Accurate Chemical). Las células se resuspendieron en dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% y suero fetal bovino (SFB) al 90% a una concentración de 10⁶ células por mililitro y se conservaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

Evaluación de PD-1, PD-L1 por citometría de flujo.

Anticuerpos. Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de superficie de células de humano: anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD56, anti-CD19, anti-CD20 anti-CD34, anti-CD45, anti-CD33, anti-CD34, anti-e-caderina, anti-citoqueratina 18 y anti-citoqueratina 19.

Evaluación de los fenotipos de las subpoblaciones celulares por citometría de flujo. Se usaron células mononucleares (CMN) de los pacientes y controles en estudio para las tinciones de antígenos de superficie. Se incubaron con 20 µl de anticuerpo durante 30 minutos, según el protocolo adecuado. Las células fueron analizadas en el citómetro de flujo FACSAria con el software FACS Diva 6.5.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Variable independiente: Adenocarcinoma.

La variable primaria de estudio fue la sobre-expresión del receptor PD1 y PD-L1.

Evaluación de otras variables a nuestro estudio.

Se realizó la recolección de datos a través del expediente electrónico y por entrevista directa en el consultorio de la clínica cáncer de pulmón. La información que se recolectó fueron variables como: Edad, género, síntomas, fecha de diagnóstico, factores asociados al cáncer de pulmón como; tabaquismo, índice tabáquico, exposición a asbesto, humo de leña, horas-años expuestos a humo de leña, tipo y subtipo histológico, respuesta a quimioterapia, entre otros.

Con fines descriptivos, las variables continuas fueron medidas como medias aritméticas, medianas y desviaciones estándar, las variables categóricas se comprenderán en proporciones con intervalos de confianza al 95%.

Las comparaciones diferenciales se realizaron mediante la prueba de t de Student o la prueba U de Mann-Whitney, de acuerdo a los datos (Normales y anormales) determinados a partir de la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Se utilizó la prueba de Chi cuadrada para determinar diferencias significativas entre las variables categóricas. Se determinó como estadísticamente significativo al valor de probabilidad menor o igual a 0.05 ($p < 0.05$), con un diseño de dos colas. Las variables estadísticamente significativas y aquellas marginalmente significativas ($p < 0.1$) se incluyeron en el análisis multivariado de regresión logística.

La supervivencia libre de progresión y global fue calculada mediante las tablas de supervivencia de Kaplan-Meier, mientras que las comparaciones entre los subgrupos se analizaron con las pruebas de Log Rank (Rango/diario) o las pruebas de Breslow.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa de software SPSS versión 15 (SPSS, Inc. Chicago, IL, USA).

Consideraciones éticas.

Este protocolo así como las cartas de consentimiento informado para sujetos sanos y pacientes han sido sometidos a los comités de bioética de las instituciones participantes y serán aprobados antes de su implementación en caso de ser aprobada esta propuesta.

Proceso de obtención del consentimiento informado

Entrevista amable y directa con el paciente y familiar, informando en que consiste el estudio. Es responsabilidad de los investigadores, obtener el consentimiento informado por escrito de cada individuo que participe en este estudio, después de una explicación adecuada de la finalidad, métodos, objetivos y riesgos potenciales del estudio.

Asimismo, deberá explicarse a los sujetos que son completamente libres de negarse a entrar en el estudio o de retirarse de él en cualquier momento por cualquier razón.

En el caso de sujetos no calificados o incapaces de dar un consentimiento legal, el consentimiento por escrito debe ser obtenido de un representante legalmente aceptable. En el caso de que tanto el sujeto como su representante legalmente aceptado sean incapaces de leer, un testigo imparcial deberá estar presente durante toda la discusión del consentimiento informado. Una vez que el sujeto y su representante hayan consentido verbalmente la participación en el estudio, la firma del testigo avalará que la información del formulario fue explicada con precisión y comprometida

Consideraciones de bioseguridad

PROCESO DE OBTENCION DE MUESTRAS.

1.1 Obtención de células mononucleares de sangre periférica.

Previo consentimiento informado y antes de recibir algún tratamiento, se obtuvo muestra de sangre periférica de 15 ml de cada sujeto incluido en el estudio, (pacientes y controles). Se emplearon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los diferentes grupos de sujetos separadas por radiante de centrifugación (Polymorphprep, Accurate Chemical). Las células se resuspendieron en dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% y suero fetal bovino (SFB) al 90% a una concentración de 10^6 células por mililitro y se conservaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

1.2 Destino final de las muestras.

Las muestras obtenidas en el marco del desarrollo de este proyecto, se almacenaron solo en caso de contar con remanente de las mismas. En el caso de células de sangre periférica, éstas se almacenaron a -170°C en nitrógeno líquido de manera indefinida. Este procedimiento asegura la conservación del material biológico útil a menos por un periodo de 5 años.

RESULTADOS

En la tabla 1 se describen las características generales de la cohorte de pacientes incluida en este estudio ($N = 23$). Dichos pacientes eran candidatos a recibir una segunda línea de tratamiento durante el período estudiado ya que presentaron progresión durante el seguimiento. Se compararon 4 diferentes tratamientos de 2da línea, entre ellos, quimioterapia convencional (cisplatino, gemcitabina, pemetrexed y docetaxel), terapia blanco (afatinib) y el fármaco de estudio, nivolumab (anticuerpo dirigido contra la molécula PD-1).

La media de edad de nuestra cohorte de pacientes es de ≤ 57 años. No hubo diferencias entre el género masculino y femenino, la relación es 1:1. La mayoría de los pacientes se encontraba en EC avanzado (IV) en 72.2%; la enfermedad oligometastásica si bien no fue estadísticamente significativa, se presentaba con mayor frecuencia respecto a enfermedad en múltiples sitios. También se incluyeron paciente con enfermedad en Sistema Nervioso Central, sin diferencia entre los grupos estudiados. En cuanto al tratamiento recibido, afatinib fue administrado exclusivamente a mujeres (6/6). El afatinib es un medicamento que va dirigido contra la activación aberrante de la tirosina cinasa secundario a mutaciones del gen EGFR, y en mujeres es más frecuente dicha mutación.

No se encontraron diferencias para otros parámetros clínicos estudiados, tales como tabaquismo, exposición a humo de leña, Diabetes Mellitus o derrame. El único parámetro que mostró significancia fue la Hipertensión Arterial con $P = 0.041$, encontrando a la mayoría de los pacientes sin dicha comorbilidad.

Posteriormente sólo se comparó el fármaco en estudio anti-PD-1 contra la terapia de segunda línea convencional (docetaxel), esto debido a que este es el fármaco de elección en segunda línea para CPCNP, independientemente del estado mutacional de EGFR. Además, para el caso de cisplatino y pemetrexed, sólo se incluyeron a 1 paciente respectivamente, haciendo difícil realizar una comparación estadísticamente correcta.

A partir de la tabla 2 analizamos solamente las diferencias entre el docetaxel y el nivolumab, enfocándonos a la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en distintas poblaciones celulares: linfocitos CD4+, linfocitos CD8+, neutrófilos, monocitos, células NK y células NKT.

En la tabla 2 se muestran los resultados del análisis bivariado en donde se comparó las características generales con los parámetros de porcentaje e intensidad media de fluorescencia (IMF) en las diferentes subpoblaciones celulares, en las cuales se observó una asociación entre la IMF de PD-L1 con la presencia de derrame pleural, con una $P = 0.012$

En la tabla 2 se muestran los resultados del análisis bivariado en donde se compararon los parámetros de porcentaje e intensidad media de fluorescencia (IMF) totales antes y después del inicio del tratamiento con nivolumab y docetaxel. Se destaca de forma interesante el descenso del porcentaje de PD-1 de 0.75 a 0.575 con $P = 0.000$ posterior al tratamiento con nivolumab, observándose un efecto contrario en los pacientes que recibieron docetaxel, ya que de 0.23 ascendió a 1.395 con $P = 0.000$

De igual manera, observamos que tanto el porcentaje de PD-L2 (en pacientes con nivolumab y docetaxel) como la IMF (sólo nivolumab) aumentaron de forma importante, con significancia estadística.

Continuando con el análisis de las subpoblaciones, en la tabla 3 encontramos la información concerniente a los linfocitos (CD3+), en los que encontramos nuevamente un aumento en el patrón de expresión de PD-L2 tanto en la subpoblación total de linfocitos como para la población CD4+ en porcentaje de expresión y la IMF en los pacientes del grupo de nivolumab. En el grupo de pacientes que recibieron docetaxel, se observa la expresión de aumentada de PD-L2 al analizar la IMF de la población total de linfocitos y el porcentaje del mismo en la subpoblación de CD8+

En la tabla 4 correspondiente a los monocitos, como hallazgos podemos destacar el descenso del porcentaje de PD-1 en los pacientes con nivolumab, aunque no fue estadísticamente significativo, se observa también una

tendencia en el brazo de docetaxel al aumento de la expresión de esta molécula.

Por último, tenemos la información para las células NK y NKT (tabla 6). Destaca el descenso de células NKT así como su expresión de PD-1 tanto en porcentaje como en IMF en las células; de manera interesante se observa un aumento de estas mismas células en el grupo aleatorizado a recibir docetaxel, con descenso también de PD-1. Si bien no fue estadísticamente significativo, también disminuyó la población de células NK ($P = 0.169$).

Tablas

Tabla 1. Características generales de pacientes con CPCNP con distintos tratamientos.						
Características	Tratamientos de 2° línea					P*
	Nivolumab N= 9 (%)	Docetaxel N= 6 (%)	Afatinib N= 6 (%)	Platino + Gemcitabina N= 9 (%)	Pemetrexed N= 9 (%)	
Edad						
≤ 57	55.5 (5/9)	33.3 (2/6)	83.3 (5/6)	0 (0/1)	0 (0/1)	0.248
> 57	44.4 (4/9)	66.7 (4/6)	16.7 (1/6)	100 (1/1)	100 (1/1)	
Genero						
Femenino	44.4 (4/9)	33.3 (2/6)	100 (6/6)	0 (0/1)	0 (0/1)	0.068
Masculino	55.5 (5/9)	66.7 (4/6)	0 (0/6)	100 (1/1)	100 (1/1)	
Tabaquismo						
No	44.4 (4/9)	66.7 (4/6)	100 (6/6)	0 (0/1)	0 (0/1)	0.089
Sí	55.5 (5/9)	33.3 (2/6)	0 (0/6)	100 (1/1)	100 (1/1)	
Humo de leña						
No	77.8 (7/9)	83.3 (5/6)	50 (3/6)	100 (1/1)	0 (0/1)	0.327
Sí	22.2 (2/9)	16.7 (1/6)	50 (3/6)	0 (0/1)	100 (1/1)	
HAS						
No	88.9 (8/1)	66.7 (4/6)	100 (6/6)	0 (0/1)	1 (0/1)	0.041
Sí	11.1 (1/9)	33.3 (2/6)	0 (0/6)	100 (1/1)	101 (1/1)	
DM						
No	77.8 (7/9)	83.3 (5/6)	100 (6/6)	100 (1/1)	0 (0/1)	0.173
Sí	22.2 (2/9)	16.7 (1/6)	0 (0/6)	0 (0/1)	100 (1/1)	
Histología						
Adenocarcinoma	88.9 (8/1)	83.3 (5/6)	100 (6/6)	0 (0/1)	100 (1/1)	0.099
Epidermoide	11.1 (1/9)	16.7 (1/6)	0 (0/6)	100 (1/1)	0 (0/1)	
EC						
IIIB	22.2 (2/9)	16.7 (1/6)	0 (0/6)	100 (1/1)	0 (0/1)	0.173
IV	77.8 (7/9)	83.3 (5/6)	100 (6/6)	0 (0/1)	100 (1/1)	
Metástasis						
No	22.2 (2/9)	16.7 (1/6)	0 (0/6)	100 (1/1)	0 (0/1)	0.173
Sí	77.8 (7/9)	83.3 (5/6)	100 (6/6)	0 (0/1)	100 (1/1)	
Oligometástasis						
No	88.9 (8/1)	83.3 (5/6)	66.7 (4/6)	100 (1/1)	0 (0/1)	0.283
Sí	11.1 (1/9)	16.7 (1/6)	33.3 (2/6)	0 (0/1)	100 (1/1)	
Metástasis SNC						
No	66.7 (6/9)	66.7 (4/6)	33.3 (2/6)	100 (1/1)	100 (1/1)	0.492
Sí	33.3 (3/9)	33.3 (2/6)	66.7 (4/6)	0 (0/1)	0 (0/1)	
Derrame						
No	33.3 (3/9)	83.3 (5/6)	33.3 (2/6)	100 (1/1)	100 (1/1)	0.178
Sí	66.7 (6/9)	16.7 (1/6)	66.7 (4/6)	0 (0/1)	0 (0/1)	
ECOG						
1	100 (9/9)	100 (6/6)	101 (6/6)	100 (1/1)	100 (1/1)	N.A
2 y 3	0 (0/9)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/1)	0 (0/1)	
Karnofsky						
80	11.1 (1/9)	0 (0/6)	33.3 (2/6)	0 (0/1)	0 (0/1)	0.492
90	88.9 (8/9)	100 (6/6)	66.7 (4/6)	100 (1/1)	100 (1/1)	

Abreviaturas: CPCNP= Cáncer De pulmón de células no pequeñas; ECOG= Eastern Cooperative Oncology Group; KPS= Karnofsky performance score, SNC= Sistema Nervioso Central.

Tabla 2. Porcentaje e IMF PD-1, PD-L1, PD-L2 total en pacientes con CPCNP.

Tratamientos de 2° línea.							
Nivolumab				Docetaxel			
Parámetro	Nivolumab 1° Toma N= 7 mediana (rango)	Nivolumab 2° Toma N= 2 mediana (rango)	P*	Parámetro	Docetaxel 1° Toma N= 5 mediana (rango)	Docetaxel 2° Toma N= 4 mediana (rango)	P*
% PD-1	0.75 (0.35-1.29)	0.575 (0.46-0.69)	0.000	% PD-1	0.23 (0.06-0.56)	1.395 (0.05-2.59)	0.000
MFI PD-1	7067 (5732-66900)	5355 (4202-6508)	0.179	MFI PD-1	5689 (2821-25100)	7650 (2214-33100)	0.420
% PD-L1	1.1 (0.1-13.20)	0.91 (0.0-1.82)	0.803	% PD-L1	1.21 (0.6-2.92)	1.111 (0.03-18.10)	0.022
MFI PD-L1	8354 (2076-20200)	1013.5 (0.0-2027)	0.100	MFI PD-L1	2066 (1301-8199)	3428 (1440-5150)	0.304
% PD-L2	0.168 (0.01-5)	0.8845 (0.12-1.65)	0.043	% PD-L2	0.08 (0.2-0.27)	0.112 (0.04-0.3)	0.853
MFI PD-L2	45900 (1617-202000)	52301.5 (1603-103000)	0.000	MFI PD-L2	5920 (2032-23000)	17202.5 (4116-163000)	0.026

Abreviaturas: CPCNP= Cáncer De pulmón de células no pequeñas; MFI= Intensidad Media de Fluorescencia.

Tabla 3. Porcentaje e IMF de PD-1, PD-L1, PD-L2 en linfocitos en pacientes con CPCNP.

Tratamientos de 2° línea.

Nivolumab				Docetaxel			
Parámetro	Nivolumab 1a Toma n= 7 mediana (rango)	Nivolumab 2a Toma n= 2 mediana (rango)	P*	Parámetro	Docetaxel 1a Toma n= 5 mediana (rango)	Docetaxel 2a Toma n= 4 mediana (rango)	P*
% CD3	2.54 (0.77-38.4)	3.415 (2.23-4.6)	0.091	% CD3	1.28 (0.1-319)	3.425 (2.15-5.31)	0.053
% CD3 PD-1	5.07 (0.32-41.2)	7.255 (4.51-10)	0.307	% CD3 PD-1	10.3 (2.53-12.3)	2.365 (0.75-6.77)	0.039
MFI CD3 PD-1	4270 (2625-6043)	4506 (4449-4563)	0.063	MFI CD3 PD-1	3774 (2612-5979)	5768.5 (2939-6689)	0.675
% CD3 PD-L1	48.6 (0.10-303)	19 (0.0-38)	0.897	% CD3 PD-L1	24.8 (9.78-39.60)	4 (0.06-58.6)	0.141
MFI CD3 PD-L1	1619 (477-8087)	785 (0.0-1570)	0.125	MFI CD3 PD-L1	814 (584-1971)	954.5 (465-3469)	0.152
% CD3 PD-L2	0.758 (0.0-70.5)	44.485 (0.07-88.9)	0.001	% CD3 PD-L2	1.13 (0.0-71.1)	2.475 (0.52-23.9)	0.196
MFI CD3 PD-L2	31400 (0.0-68700)	43955.5 (1511-86400)	0.000	MFI CD3 PD-L2	1515 (0.0-20700)	4384 (600-124000)	0.024
% CD3 CD4	56.5 (38.2-80.8)	47.15 (41-53.3)	0.224	% CD3 CD4	36.8 (31.9-52.5)	39.95 (36.1-43.7)	0.252
% CD3 CD4 PD-1	2.71 (0.0-10.70)	4.24 (0.97-7.51)	0.309	% CD3 CD4 PD-1	6.88 (3.86-19.10)	2.66 (0.61-8.57)	0.180
MFI CD3 CD4 PD-1	3565 (0.0-7780)	6252.5 (4617-7888)	0.586	MFI CD3 CD4 PD-1	4265 (3398-5508)	6467.5 (1578-6706)	0.085
% CD3 CD4 PD-L1	18.5 (0.0-51.8)	31.95 (0.0-63.9)	0.000	% CD3 CD4 PD-L1	15.5 (4.53-69.2)	6.105 (0.0-40.40)	0.306
MFI CD3 CD4 PD-L1	1820 (0.0-8949)	846 (0.0-1692)	0.080	MFI CD3 CD4 PD-L1	808 (683-1749)	888.5 (0.0-1279)	0.767
% CD3 CD4 PD-L2	0.28 (0.0-5.71)	39.8 (0.0-79.6)	0.000	% CD3 CD4 PD-L2	0 (0.0-81.6)	0.125 (0.0-42)	0.417
MFI CD3 CD4 PD-L2	5055 (0.0-10300)	854.5 (0.0-1709)	0.000	MFI CD3 CD4 PD-L2	0 (0.0-24000)	265 (0.0-4751)	0.119
% CD3 CD8	38.5 (14.20-50.1)	49.45 (40.50-58.4)	0.147	% CD3 CD8	50.6 (38.9-64.7)	53.9 (39.6-62.6)	0.941
% CD3 CD8 PD-1	17.5 (3.20-28.7)	19.85 (10.3-29.4)	0.012	% CD3 CD8 PD-1	7.88 (6.43-21.2)	3.79 (0.0-28.6)	0.177
MFI CD3 CD8 PD-1	1984 (1253-7155)	3311 (1003-5619)	0.011	MFI CD3 CD8 PD-1	1546 (859-4521)	2890 (0.0-65500)	0.014
% CD3 CD8 PD-L1	24.5 (0.0-88)	10.6 (0.0-21.20)	0.554	% CD3 CD8 PD-L1	12.3 (8.7-58.6)	5.5 (0.0-81.6)	0.406
MFI CD3 CD8 PD-L1	1192 (0.0-3116)	691.5 (0.0-1383)	0.262	MFI CD3 CD8 PD-L1	740 (539-2016)	487.5 (0.0-4528)	0.067
% CD3 CD8 PD-L2	0 (0.0-88.1)	48.9 (0.5-97.3)	0.171	% CD3 CD8 PD-L2	1.23 (0.61-97.10)	5.015 (0.0-9.03)	0.000
MFI CD3 CD8 PD-L2	0 (0.0-76300)	40045 (1390-78700)	0.219	MFI CD3 CD8 PD-L2	1750 (1088-17100)	1093.5 (0.0-1463)	0.076

Abreviaturas: CPCNP= Cáncer De pulmón de células no pequeñas; MFI= Intensidad Media de Fluorescencia.

Tabla 4. Porcentaje e IMF de PD-1, PD-L1, PD-L2 en granulocitos (neutrófilos) en pacientes con CPCNP.

Tratamientos de 2° línea.							
Nivolumab				Docetaxel			
Parámetro	Nivolumab 1° Toma N= 7 mediana (rango)	Nivolumab 2° Toma N= 2 mediana (rango)	P*	Parámetro	Docetaxel 1° Toma N= 5 mediana (rango)	Docetaxel 2° Toma N= 4 mediana (rango)	P*
% CD66	6.73 (5.66-47.6)	13.455 (3.51-23.4)	0.849	% CD66	9.91 (2.77-25.60)	26.25 (4-55.7)	0.455
% CD66 PD-1	9.83 (5-81.2)	4.59 (1.69-7.49)	0.018	% CD66 PD-1	0.967 (0.41-72.80)	3.27 (0.99-86.4)	0.550
MFI CD66 PD-1	3849 (1438-9104)	3461.5 (3117-3806)	0.314	MFI CD66 PD-1	3323 (982-5319)	4933.5 (641-7010)	0.350
% CD66 PD-L1	18.8 (6.55-86.5)	4.685 (0.37-9)	0.171	% CD66 PD-L1	25.8 (0.07-48.4)	15.184 (0.2-74.8)	0.286
MFI CD66 PD-L1	3141 (1652-13800)	2615.5 (1121-4110)	0.564	MFI CD66 PD-L1	1006 (728-2783)	2728.5 (635-11000)	0.055

Abreviaturas: CPCNP= Cáncer De pulmón de células no pequeñas; MFI= Intensidad Media de Fluorescencia.

Tabla 5. Porcentaje e IMF de PD-1, PD-L1, PD-L2 en monocitos en pacientes con CPCNP.

Tratamientos de 2° línea.							
Nivolumab				Docetaxel			
Parámetro	Nivolumab 1° Toma N= 7 mediana (rango)	Nivolumab 2° Toma N= 2 mediana (rango)	P*	Parámetro	Docetaxel 1° Toma N= 5 Mediana (rango)	Docetaxel 2° Toma N= 4 mediana (rango)	P*
% CD14	5.37 (0.3-22.7)	3.83 (0.55-4.32)	0.331	% CD14	1.61 (0.18-3.98)	4.47 (2.14-12.7)	0.094
% CD14 PD-1	3.55 (0.7-30.3)	0.095 (0.07-1.93)	0.143	% CD14 PD-1	2.19 (1.13-8.36)	0.76 (0.25-1.05)	0.076
MFI CD14 PD-1	9519 (2781-42700)	2042 (1592-7373)	0.159	MFI CD14 PD-1	41600 (6681-77000)	24350 (4499-37400)	0.679
% CD14 PD-L1	53.5 (6.73-85.3)	0 (0.0-56.9)	0.664	% CD14 PD-L1	33.5 (2.63-57.7)	2.835 (0.09-73.2)	0.292
MFI CD14 PD-L1	1405 (890-2537)	0 (0.0-481)	0.232	MFI CD14 PD-L1	1744 (930-23200)	7430 (1611-23200)	0.992
% CD14 PD-L2	0.252 (0.0-0.4)	0.024 (0.0-0.04)	0.030	% CD14 PD-L2	0.47 (0.08-1.17)	0.248 (0.04-0.63)	0.134
MFI CD-14 PD-L2	60500 (0.0-193000)	104000 (0.0-130000)	0.841	MFI CD-14 PD-L2	126000 (123000-166000)	96800 (56500-131000)	0.153

Abreviaturas: CPCNP= Cáncer De pulmón de células no pequeñas; MFI= Intensidad Media de Fluorescencia.

Tabla 6. Porcentaje e IMF de PD-1, PD-L1, PD-L2 en NK y NKT en pacientes con CPCNP.

Tratamientos de 2° línea.							
Nivolumab				Docetaxel			
Parámetro	Nivolumab 1° Toma N= 7 mediana (rango)	Nivolumab 2° Toma N= 2 mediana (rango)	P*	Parámetro	Docetaxel 1° Toma N= 5 mediana (rango)	Docetaxel 2° Toma N= 4 mediana (rango)	P*
% CD56 CD16	30.5 (0.51-74)	0.906 (0.52-2.01)	0.169	% CD56 CD16	7.46 (0.2-13.5)	9.86 (1.53-80.3)	0.028
% CD56 CD16 PD-1	3.54 (0.42-27)	1.42 (0.2-1.69)	0.229	% CD56 CD16 PD-1	0.929 (0.28-6.10)	0.5025 (0.19-2.55)	0.052
MFI CD56 CD16 PD-1	6199 (1746-29400)	5074 (596-15200)	0.688	MFI CD56 CD16 PD-1	28000 (6850-51800)	6393.5 (4356-31500)	0.481
% CD56 CD16 PD-L1	26.8 (8.7-82.5)	0 (0.0-19.3)	0.130	% CD56 CD16 PD-L1	22.2 (10.2-89.1)	3.164 (0.0-66.9)	0.910
MFI CD56 CD16 PD-L1	1283 (904-3106)	0 (0.0-1066)	0.982	MFI CD56 CD16 PD-L1	902 (629-3614)	1776.85 (0.0-4427)	0.019
% CD56 CD16 PD-L2	0.006 (0.0-0.2)	0 (0.0-0.2)	0.392	% CD56 CD16 PD-L2	0.062 (0.0-0.4)	0.031 (0.0-0.1)	0.035
MFI CD56 CD16 PD-L2	18500 (0.0-74900)	0 (0.0-104000)	0.138	MFI CD56 CD16 PD-L2	50900 (0.0-105000)	48250 (0.0-105000)	0.728
% CD3 CD56 CD16	2.46 (0.02-25.6)	0.053 (0.0-0.16)	0.039	% CD3 CD56 CD16	0.117 (0.02-4.3)	1.253 (0.22-4.8)	0.701
% CD3 CD56 CD16 PD-1	2.8 (1.5-20)	0 (0.0-4.10)	0.008	% CD3 CD56 CD16 PD-1	5.15 (1.58-29.7)	1.115 (0.19-2-62)	0.006
MFI CD3 CD56 CD16 PD-1	8750 (7173-22000)	0 (0.0-178000)	0.000	MFI CD3 CD56 CD16 PD-1	76200 (13600-227000)	28850 (5137-67800)	0.016
% CD3 CD56 CD16 PD-L1	40 (19.3-75.3)	0 (0.0-4.8)	0.053	% CD3 CD56 CD16 PD-L1	40 (4.84-64.9)	3.435 (0.15-15.2)	0.084
MFI CD3 CD56 CD16 PD-L1	2280 (1022-5359)	0 (0.0-5036)	0.204	MFI CD3 CD56 CD16 PD-L1	2805 (2059-24600)	8529 (2494-25800)	0.961
% CD3 CD56 CD16 PD-L2	0.358 (0.0-5)	0 (0.0-1.9)	0.723	% CD3 CD56 CD16 PD-L2	1.08 (0.84-8.57)	1.11 (0.1-4.71)	0.474
MFI CD3 CD56 CD16 PD-L2	83600 (0.0-141000)	0 (0.0-130000)	0.349	MFI CD3 CD56 CD16 PD-L2	155000 (66600-212000)	62850 (41300-145000)	0.727

Abreviaturas: CPCNP= Cáncer De pulmón de células no pequeñas; MFI= Intensidad Media de Fluorescencia.

DISCUSIÓN

De forma interesante encontramos en este estudio encontramos una asociación entre el tratamiento y la expresión total de PD-1, observándose una disminución en sangre periférica al haber recibido tratamiento con el anticuerpo nivolumab. Como se comentó previamente en la introducción, existe información principalmente de tipo pronóstica y en tejido tumoral³¹; hasta el momento no se ha reportado su análisis en subpoblaciones celulares de sangre periférica posterior a haber recibido tratamiento sistémico (ya sea tratamiento dirigido o quimioterapia convencional); sólo se ha determinado posterior a manejo quirúrgico en pacientes con cáncer renal.³²

Para nuestro conocimiento, no se ha descrito tampoco la expresión de PD-L2; en nuestro estudio se encontró un aumento de dicha molécula posterior al tratamiento, tanto con quimioterapia como con nivolumab. Sabemos que el tejido tumoral aumenta la expresión tanto de PD-L1 y PD-L2 como parte de la evasión al sistema inmune, lo que nos lleva a pensar que la elevación de PD-L2 podría ser resultado de estos mecanismos para la inducción de inmunotolerancia.

Si bien es prematuro emitir algún tipo de conclusión de una cohorte de pacientes tan pequeña, los hallazgos significativamente estadísticos ameritan continuar investigando el papel pronóstico y predictivo que podría tener la expresión de esta molécula en sangre periférica, ya que de manera interesante nosotros encontramos un aumento con la administración de quimioterapia, sugiriendo la puesta en marcha de los mecanismos de evasión inmunológica tumoral.

Otro defecto importante de este estudio es la falta de sujetos sanos de control; sin embargo, es nuestra intención continuar con este estudio e incluir a una mayor cantidad tanto de pacientes como de sujetos control con la finalidad de evitar estos errores metodológicos y obtener información fehaciente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kaufman, H. L., Kirkwood, J. M., Hodi, F. S., Agarwala, S., Amatruda, T., Bines, S. D., ... Atkins, M. B. (2013). The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on tumour immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma. *Nat Rev Clin Oncol*, 10(10), 588–598.
2. Ott, P. a., Hodi, F. S., & Robert, C. (2013). CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19(19), 5300–9. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0143
3. Blank, C., & Mackensen, A. (2007). Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, 56(5), 739–45. doi:10.1007/s00262-006-0272-1
4. Ríos, P. R., Isabel, M., Colindres, S., Piñon, G. V., Guadiana, M. C., García, A. M., & Mohar, A. (2007). Registro Hospitalario de Cáncer: Compendio de Cáncer 2000 – 2004, 2.
5. Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 127(12), 2893–2917. doi:10.1002/ijc.25516
6. Detterbeck, F. C., Boffa, D. J., & Tanoue, L. T. (2009). The new lung cancer staging system. *CHEST Journal*, 136(1), 260–271.
7. Arrieta, O., Alba, E. G., Alba-lópez, L. F., Acosta-espinoza, A., Alatorre-alexander, J., Alexander-meza, J. F., ... Zamora-moreno, J. (2013). Consenso nacional de diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas, 65, 5–84.
8. Hall, R. D., Gray, J. E., & Chiappori, A. a. (2013). Beyond the standard of care: a review of novel immunotherapy trials for the treatment of lung cancer. *Cancer Control : Journal of the Moffitt Cancer Center*, 20(1), 22–31.
9. Manuscript, A., & Factors, R. (2009). *NIH Public Access*, 83(5), 584–594.
10. Travis, W. D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A. G., Geisinger, K. R., Yatabe, Y., ... Yankelewitz, D. (2011). International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 6(2), 244–85. doi:10.1097/JTO.0b013e318206a221
11. Warth, A., Muley, T., Meister, M., Stenzinger, A., Thomas, M., Schirmacher, P., ... Weichert, W. (2012). The novel histologic International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a

- stage-independent predictor of survival. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(13), 1438–46. doi:10.1200/JCO.2011.37.2185
12. Shim, H. S., Lee, D. H., Park, E. J., & Kim, S. H. (2011). Histopathologic characteristics of lung adenocarcinomas with epidermal growth factor receptor mutations in the International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society lung adenocarcinoma classification. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 135(10), 1329–34. doi:10.5858/arpa.2010-0493-OA
 13. Cooper, W. a, O'toole, S., Boyer, M., Horvath, L., & Mahar, A. (2011). What's new in non-small cell lung cancer for pathologists: the importance of accurate subtyping, EGFR mutations and ALK rearrangements. *Pathology*, 43(2), 103–15. doi:10.1097/PAT.0b013e328342629d
 14. Kwak, E., Bang Y., Camidge, R., Shaw, A.,... Iafrate, J. (2010). Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 363(18): 1693–1703. doi:10.1056/NEJMoa1006448.
 15. Raez, L. E., Fein, S., & Podack, E. R. (2005). Lung cancer immunotherapy. *Clinical Medicine & Research*, 3(4), 221–8.
 16. Sakthivel, P., Gereke, M., & Bruder, D. (2012). Therapeutic intervention in cancer and chronic viral infections: antibody mediated manipulation of PD-1/PD-L1 interaction. *Reviews on Recent Clinical Trials*, 7(1), 10–23.
 17. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., & Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133(5), 775–87. doi:10.1016/j.cell.2008.05.009
 18. Callahan, M. K., & Wolchok, J. D. (2013). At the bedside: CTLA-4- and PD-1-blocking antibodies in cancer immunotherapy. *Journal of Leukocyte Biology*, 94(1), 41–53. doi:10.1189/jlb.1212631
 19. Kyi, C., & Postow, M. A. (2014). Checkpoint blocking antibodies in cancer immunotherapy. *FEBS Letters*, 588(2), 368–76. doi:10.1016/j.febslet.2013.10.015
 20. Intlekofer, A. M., & Thompson, C. B. (2013). At the bench: preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy. *Journal of Leukocyte Biology*, 94(1), 25–39. doi:10.1189/jlb.1212621
 21. Topalian, S. L., Drake, C. G., & Pardoll, D. M. (2012). Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Current Opinion in Immunology*, 24(2), 207–212. doi:10.1016/j.coi.2011.12.009
 22. Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Ph, D., Schadendorf, D., ... Urba, W. J. (2014). *The New England Journal of Medicine*, 711–723.
 23. Wolchok, J. D., Kluger, H., Callahan, M. K., Postow, M. a, Rizvi, N. a, Lesokhin, A. M., ... Sznol, M. (2013). Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 369(2), 122–33. doi:10.1056/NEJMoa1302369

24. Lynch, T. J., Bondarenko, I., Luft, A., Serwatowski, P., Barlesi, F., Chacko, R., ... Reck, M. (2012). Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line treatment in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase II study. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(17), 2046–54. doi:10.1200/JCO.2011.38.4032
25. Reck, M. (2012). What future opportunities may immuno-oncology provide for improving the treatment of patients with lung cancer? *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 23 Suppl 8(Supplement 8), viii28–34. doi:10.1093/annonc/mds260
26. Zou, W., & Chen, L. (2008). Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nature Reviews. Immunology*, 8(6), 467–77. doi:10.1038/nri2326
27. Nurieva, R. I., Liu, X., & Dong, C. (2009). Yin-Yang of costimulation: Crucial controls of immune tolerance and function. *Immunological Reviews*. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00769.x
28. Blank, C., Gajewski, T. F., & Mackensen, A. (2005). Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: Implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 54(4), 307–314. doi:10.1007/s00262-004-0593-x
29. Zielinski, C., Knapp, S., Mascaux, C., & Hirsch, F. (2013). Rationale for targeting the immune system through checkpoint molecule blockade in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, 24(5), 1170–1179.
30. Brahmer, J. R., Horn, L., Gandhi, L., Spigel, D. R., Antonia, S. J., Rizvi, N. A., ... Gettinger, S. N. (2014). Nivolumab (Anti-PD-1 ; BMS-936558 , ONO-4538) in Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC); Survival and Clinical Activity by Subgroup Analysis : Results From a Phase 1b Study, 936558.
31. Chen, Y., Mu, C.-Y., Huang, J.-A., Yb, C., Cy, M., & Ja, H. (2012). Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study. *Tumori*, 98, 751–5. doi:10.1700/1217.13499
32. Xing Y-F., Zhang X-L., Shi M-H. (2012) The level of soluble programmed death-1 in peripheral blood of patients with lung cancer and its clinical implications. *Zhonghua Jie He He Hu Zi Za Zhi* ;35 (2):102-6
33. MacFarlane, A. W., Jillab, M., Plimack, E. R., Hudes, G. R., Uzzo, R. G., Litwin, S., ... Campbell, K. S. (2014). PD-1 Expression on Peripheral Blood Cells Increases with Stage in Renal Cell Carcinoma Patients and Is Rapidly Reduced after Surgical Tumor Resection. *Cancer Immunology Research*, 2 (4), 320–331. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0133
34. Flies D., Sandler B., Sznol M. (2011) Blockade of the B7-H1/PD-1 Pathway for Cancer Immunotherapy. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 84, 409-421

35. Hwu, W., Ph, D., Topalian, S. L., Hwu, P., Chen, S., Salay, T. M., ... Pardoll, D. M. (2012). Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with *Advanced Cancer*, 2455–2465.
36. Lu, J., Lee-Gabel, L., Nadeau, M. C., Ferencz, T. M., & Soefje, S. a. (2014). Clinical evaluation of compounds targeting PD-1/PD-L1 pathway for cancer immunotherapy. *Journal of Oncology Pharmacy Practice : Official Publication of the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners*. doi:10.1177/1078155214538087
37. Hamid, O., Robert, C., Daud, A., Hodi, F. S., Hwu, W.-J., Kefford, R., ... Ribas, A. (2013). Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 369(2), 134–44. doi:10.1056/NEJMoa1305133
38. Champiat, S., Ileana, E., Giaccone, G., Besse, B., Mountzios, G., Eggermont, A., & Soria, J.-C. (2014). Incorporating immune-checkpoint inhibitors into systemic therapy of NSCLC. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 9(2), 144–53. doi:10.1097/JTO.0000000000000074