



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Expresión de PD-1 y PD-L1 en poblaciones celulares  
inmunes circulantes en sangre periférica como potencial  
biomarcador de respuesta en pacientes con cáncer de  
pulmón de células no pequeñas tratadas con  
pembrolizumab y docetaxel**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A  
P R E S E N T A:**

**Pamela García López**

**DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. Juan-Manuel Hernandez-Martinez**



**Ciudad Universitaria, CD. MX.  
2021**



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.

## AGRADECIMIENTOS

---

A mi mamá, por apoyarme en mi decisión de estudiar Biología y por regalarme una laptop para que pudiera escribir “la mejor tesis del mundo”. Gracias por tu amor y apoyo incondicional, sin ti esto hubiera sido mucho más difícil.

A mi hermana, por ser mi ejemplo a seguir desde el día en que nací. Gracias por estar a mi lado en todos mis logros, pero también en todos mis fracasos.

A mi abuelita, Silvia, por quedarse despierta para acompañarme todas esas madrugadas de estudio. Porque, aunque tú no lo supieras, me motivabas a seguir cada vez que me preguntabas “¿ya mero terminas tu tesis?” y, por fin abuelita, hoy te puedo decir que ya terminé.

A Emmanuel, por ser parte fundamental de esta etapa de mi vida. No me alcanzarían las palabras para describir todo lo que significas para mí, pero tú lo sabes. Gracias por tu amor, apoyo y comprensión. Gracias por ser un respiro del trabajo y enseñarme a ver siempre el lado chistoso de las cosas, gracias por ser mi compañero de vida y mi mejor amigo.

A mi familia, por creer en mí y por motivarme siempre a ser una mejor persona.

A mi tutor, el Dr. Juan Manuel Hernández Martínez, gracias por el apoyo, los ánimos, las comidas, los consejos, los chistes para hacer más ligero el trabajo, las clases de estadística, pero sobre todo, por ser mi amigo y compartir conmigo tu pasión por la ciencia y las ganas de siempre aprender algo nuevo.

Al Biólogo Edgar Montes Servín, por enseñarme la técnica de aislamiento de células del sistema inmunológico a partir de sangre periférica, a hacer citometría de flujo y por tu apoyo en la parte experimental de mi tesis.

A los profesores del taller “Inmunología del cáncer: del laboratorio a la aplicación clínica”, por dejarme ser parte de su grupo de investigación, compartir su conocimiento conmigo y enseñarme que la investigación que se hace en un laboratorio sí puede llegar a la clínica.

Al Dr. Óscar Gerardo Arrieta Rodríguez, por permitirme trabajar en su laboratorio y con sus pacientes.

A los médicos de la Unidad Funcional de Oncología Torácica y Laboratorio de Medicina Personalizada del Instituto Nacional de Cancerología, por ayudarme a tomar muestras de los pacientes y dejarme ver la conexión entre la investigación básica y la clínica.

A los miembros del jurado, por su apoyo en la revisión de mi tesis y por sus valiosos comentarios.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, por formarme con el pensamiento crítico que se necesita para hacer investigación científica.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de acceder a la educación media superior y superior.

# ÍNDICE

Agradecimientos .....	II
Lista de tablas .....	V
Lista de figuras .....	V
Abreviaturas y símbolos .....	VI
Resumen .....	VII
I. Introducción .....	1
Cáncer .....	1
Sistema inmune y cáncer .....	3
Puntos de control inmunológico y su papel en el cáncer .....	5
Terapias dirigidas para cáncer de pulmón .....	7
ICIs contra CPCNP .....	9
Biomarcadores en pacientes con CPCNP tratados con ICIs .....	10
II. Antecedentes .....	11
III. Objetivos .....	13
Objetivo general .....	13
Objetivos particulares .....	13
IV. Hipótesis .....	14
V. Materiales y métodos .....	15
Diseño del estudio .....	15
Sujetos de estudio .....	15
Criterios de inclusión .....	15
Criterios de exclusión .....	15
Criterios de eliminación .....	16
Metodología experimental .....	16
Obtención de características clínicas basales y datos hematológicos .....	16
Obtención de muestras de sangre periférica para la inmunofenotipificación .....	16
Aislamiento de células polimorfonucleares y mononucleares a partir de sangre periférica .....	17
Criopreservación de células polimorfonucleares y mononucleares a partir de sangre periférica .....	17
Descongelación de células previamente criopreservadas .....	17
Ensayo de viabilidad celular en contador automático TC20 .....	18
Tinción de inmunofluorescencia extracelular de células mononucleares y polimorfonucleares .....	18
Criterios de valoración .....	19
Respuesta objetiva (RO) .....	19
Supervivencia libre de progresión .....	19
Análisis estadístico .....	19

VI. Resultados.....	21
Características basales de los pacientes .....	21
Los grupos de tratamiento estuvieron balanceados .....	24
El conteo absoluto de monocitos y eosinófilos cambia durante el tratamiento de segunda línea .....	25
El conteo absoluto de eosinófilos y la concentración de ace son diferentes entre pacientes con SLP corta y SLP larga .....	27
El conteo absoluto de neutrófilos es un predictor de la respuesta .....	32
El conteo absoluto de plaquetas es un predictor de la SLP .....	33
La dinámica de la concentración de ACE es diferente entre los respondedores y los no respondedores ....	36
Existen diferencias en el inmunofenotipo entre los grupos de tratamiento .....	37
Existen diferencias en el inmunofenotipo entre los respondedores y los no respondedores .....	37
Existen diferencias en el inmunofenotipo entre los pacientes con SLP corta y SLP larga .....	39
VII. Discusión .....	46
VIII. Conclusiones .....	50
IX. Referencias .....	51
X. Anexo.....	54

## LISTA DE TABLAS

---

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes .....	22
Tabla 2. Conteos basales de biometría hemática de los pacientes.....	23
Tabla 3. RPL y RNL basales de los pacientes .....	23
Tabla 4. Concentraciones basales de albúmina y ACE de los pacientes .....	23
Tabla 5. Comparación de los valores de biometría hemática entre grupos de tratamiento .....	26
Tabla 6. Comparación de los RPL y RNL entre grupos de tratamiento .....	26
Tabla 7. Comparación de los valores de albúmina y ACE entre grupos de tratamiento .....	27
Tabla 8. Comparación de los valores de biometría hemática entre grupos de pacientes estratificados de acuerdo con la respuesta .....	28
Tabla 9. Comparación de los RPL y RNL entre grupos de pacientes estratificados de acuerdo con la respuesta .....	29
Tabla 10. Comparación de los valores de albúmina y ACE entre grupos de pacientes estratificados de acuerdo con la respuesta.....	29
Tabla 11. Comparación de los valores de biometría hemática entre grupos de pacientes estratificados de acuerdo con la duración de la SLP .....	31
Tabla 12. Comparación de los RPL y RNL entre grupos de pacientes estratificados de acuerdo con la duración de la SLP.....	31
Tabla 13. Comparación de los valores de albúmina y ACE entre grupos de pacientes estratificados de acuerdo con la duración la SLP.....	32
Tabla 14. Análisis multivariado de regresión logística binaria para predecir la respuesta en función del conteo absoluto de neutrófilos .....	33
Tabla 15. Análisis multivariado de regresión de Cox para predecir la duración de la SLP en función del conteo absoluto de plaquetas alto o bajo .....	36
Tabla 16. Comparación de los valores de citometría de flujo entre grupos de tratamiento.....	41
Tabla 17. Comparación de los valores de citometría de flujo entre grupos de pacientes estratificados de acuerdo con la respuesta .....	42
Tabla 18. Comparación de los valores de citometría de flujo entre grupos de pacientes estratificados de acuerdo con la duración de la SLP .....	44

## LISTA DE FIGURAS

---

Ilustración 1. Alteraciones necesarias para el desarrollo del cáncer. ....	1
Ilustración 2. Vía de señalización PD-1/PD-L1 .....	6
Ilustración 3. Línea del tiempo de la introducción de terapias dirigidas en CPCNP.....	8
Ilustración 4. Línea del tiempo de muestreo en los pacientes .....	16
Ilustración 5. Gráfica Kaplan-Meier de supervivencia en función del tratamiento.....	24
Ilustración 6. Estratificación de pacientes por grupo de tratamiento y respuesta.....	27
Ilustración 7. Estratificación de pacientes por grupo de tratamiento y duración de la SLP.....	30
Ilustración 8. Función de riesgo para el conteo absoluto de plaquetas por cuartiles.....	34
Ilustración 9. Gráfica Kaplan-Meier de supervivencia en función del conteo de plaquetas alto o bajo.....	35

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

---

<b>ACE:</b> antígeno carcinoembrionario	<b>OR:</b> razón de momios
<b>ALK:</b> gen de la cinasa de linfoma anaplásico	<b>PBS:</b> buffer salino de fosfatos
<b>ATP:</b> adenosín trifosfato	<b>PD-1:</b> proteína 1 de muerte celular programada
<b>Bax:</b> regulador de la apoptosis Bax	<b>PD-L1:</b> ligando de la proteína 1 de muerte celular programada
<b>Bcl-2:</b> regulador de la apoptosis Bcl-2	<b>PUMA:</b> modulador de apoptosis sobre regulada por P53
<b>Bcl-x<sub>1</sub>:</b> regulador de la apoptosis Bcl-x <sub>1</sub>	<b>R:</b> respondedores
<b>Bim:</b> proteína 11 similar a Bcl-2	<b>RAS:</b> oncogén del sarcoma de las ratas
<b>BRAF:</b> proto-oncogén B-Raf, serina treonina cinasa	<b>RBI:</b> correpresor transcripcional RB1
<b>CPCNP:</b> cáncer de pulmón de células no pequeñas	<b>RECIST 1.1:</b> criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos versión 1.1
<b>CPCP:</b> cáncer de pulmón de células pequeñas	<b>RG:</b> respuesta global
<b>CTLA-4:</b> proteína 4 asociada al linfocito T citotóxico	<b>RNL:</b> razón neutrófilos/linfocitos
<b>DAMPs:</b> patrones moleculares asociados al daño	<b>RO:</b> respuesta objetiva
<b>DTX:</b> docetaxel	<b>ROSI:</b> proto-oncogén ROS1, receptor tirosina cinasa
<b>Dx:</b> diagnóstico	<b>RPL:</b> razón plaquetas/linfocitos
<b>ECOG:</b> estatus funcional de acuerdo con la escala del grupo cooperativo de oncología del este	<b>SG:</b> supervivencia global
<b>EGFR:</b> receptor del factor de crecimiento epidérmico	<b>SLP:</b> supervivencia libre de progresión
<b>FDA:</b> administración de alimentos y drogas	<b>TGF-<math>\beta</math>:</b> factor de crecimiento transformante beta
<b>HR:</b> razón de probabilidad instantánea	<b>TIGIT:</b> inmunoreceptor de células T con dominios Ig e ITIM
<b>ICIs:</b> inhibidores de puntos de control inmunológico	<b>TIM-3:</b> receptor celular 2 del virus de la hepatitis A
<b>IFN-<math>\gamma</math>:</b> interferón gamma	<b>TKI:</b> inhibidor de tirosina cinasa
<b>IGF:</b> factor de crecimiento insulínico	<b>TMB:</b> carga mutacional tumoral
<b>LAG-3:</b> gen 3 de activación de linfocitos	<b>TP53:</b> gen de la proteína tumoral p53
<b>MFI:</b> intensidad media de fluorescencia	<b>TSP-1:</b> trombospondina 1
<b>MHC:</b> complejo mayor de histocompatibilidad	<b>VEGF:</b> factor de crecimiento endotelial vascular
<b>MYC:</b> proto-oncogen MYC	
<b>NR:</b> no respondedores	

## RESUMEN

---

El cáncer de pulmón representa el segundo lugar en incidencia y el primero en mortalidad en el mundo. En México, ocupa la séptima posición en la lista de incidencia de cáncer por sitio, sin embargo, es la cuarta enfermedad neoplásica con mayor mortalidad asociada. Por lo que el cáncer de pulmón es un problema grave de salud pública en nuestro país.

Las células neoplásicas, pueden evadir el ataque del sistema inmunológico mediante la sobreproducción de moléculas co-inhibitorias, como el ligando 1 de muerte celular programada (PD-L1); cuya unión con la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1), ubicada en la membrana de macrófagos, linfocitos T y B, células NK, y algunas células mieloides; atenúa la respuesta inmunológica. Los inhibidores de puntos de control inmunológico (ICIs), como pembrolizumab, nivolumab y atezolizumab, son anticuerpos monoclonales que bloquean la unión de moléculas co-inhibitorias, como PD-1 y PD-L1, para reestablecer la respuesta inmune antitumoral. El tratamiento con ICIs ha aumentado la supervivencia de algunos pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP). Sin embargo, muchos de los pacientes tratados con ICIs no se ven beneficiados por este tipo de tratamientos. Por ello, un aspecto importante del uso de ICIs es la identificación de biomarcadores pronósticos y predictivos, que ayuden a seleccionar a aquellos pacientes con mayor potencial de obtener un beneficio clínico de ellos.

Actualmente, el biomarcador predictivo más utilizado en la práctica clínica para seleccionar a aquellos pacientes con CPCNP con mayor potencial de beneficiarse del tratamiento con ICIs dirigidos contra PD-1/PD-L1, como el pembrolizumab, es la abundancia de PD-L1 en tejido tumoral, la cual es evaluada mediante inmunohistoquímica. Sin embargo, algunos ensayos clínicos han demostrado que no hay una asociación consistente entre la abundancia tumoral de PD-L1 y el beneficio clínico que los pacientes obtienen de este tipo de tratamientos. Por lo tanto, la búsqueda de mejores biomarcadores continúa siendo un área de investigación importante. Una alternativa menos costosa e invasiva que la evaluación de PD-L1 en tejido tumoral, es la evaluación de parámetros hematológicos indicadores de una respuesta inmune antitumoral.

El objetivo de este proyecto de tesis fue la búsqueda de biomarcadores que permitan seleccionar a pacientes con CPCNP con un mayor potencial de obtener un beneficio clínico de ICIs dirigidos contra el eje PD-1/PD-L1. El proyecto involucró un análisis exploratorio de los pacientes incluidos en el ensayo clínico de fase II PROLUNG, en el cual se comparó la eficacia de docetaxel versus la combinación de pembrolizumab con docetaxel en pacientes con CPCNP. En particular, se exploró si existía una asociación entre la abundancia de leucocitos en sangre periférica (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos), así como de la concentración en sangre de albúmina y antígeno carcinoembrionario (ACE), cuantificados por biometría hemática, con la tasa de respuesta objetiva (RO) y/o con la supervivencia libre de progresión (SLP).

Subsecuentemente, para investigar con mayor detalle la identidad de estas poblaciones, se realizó la inmunofenotipificación por medio de citometría de flujo.

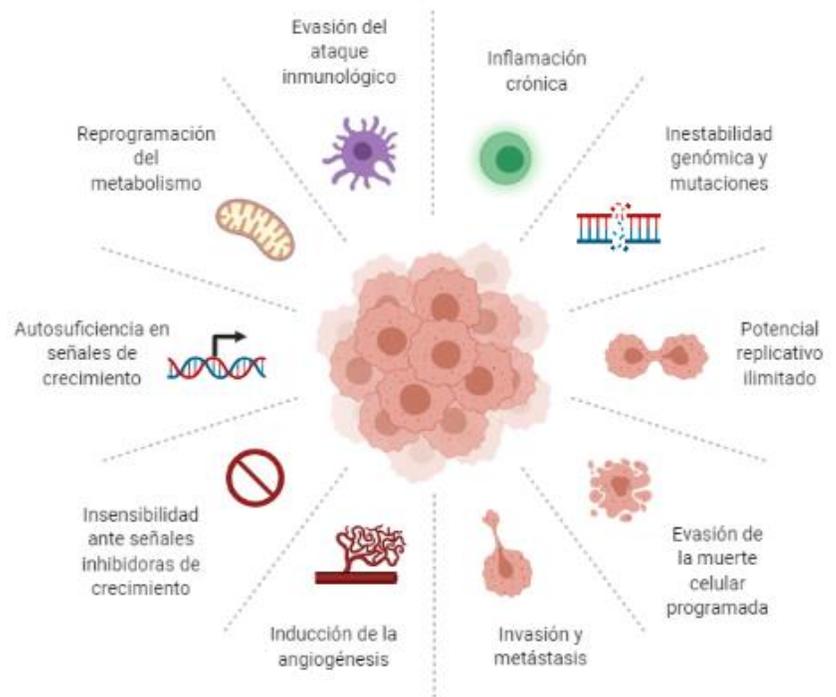
Los resultados obtenidos indican que los pacientes sin RO tienen un conteo de neutrófilos, evaluado después del inicio del tratamiento, más elevado que aquellos con RO (4.70 vs 3.75,  $p=0.025$ ). Un análisis de regresión logística confirmó el carácter predictivo del conteo alto de neutrófilos después del inicio del tratamiento como un factor asociado a una menor tasa de respuesta (OR=0.642, IC 95%=0.434-0.950,  $p=0.027$ ), independientemente de otras variables. Así mismo, se encontró que el conteo de plaquetas evaluado después del inicio del tratamiento es más elevado en pacientes con SLP corta (<9.3 meses) que en aquellos con SLP larga (352.99 vs 262.50,  $p=0.048$ ). Este efecto solo se observó en el grupo de pacientes tratados con pembrolizumab + docetaxel, en el que un análisis de regresión de Cox confirmó el carácter predictivo del conteo alto de plaquetas después del inicio del tratamiento como un factor asociado a una menor SLP (HR=0.166, IC 95%=0.042-0.659,  $p=0.011$ ). Además, en los pacientes con RO tratados con pembrolizumab en combinación con docetaxel hay una disminución de la concentración de ACE en sangre durante el tratamiento. Mientras que, los pacientes tratados con docetaxel y con SLP corta, tienen una concentración de ACE en sangre significativamente más elevada que aquellos pacientes con SLP larga. Finalmente, se identificó que la abundancia de algunas subpoblaciones de linfocitos, células plasmáticas, células NK, neutrófilos y monocitos, así como su expresión de PD-1 y PD-L1, evaluada antes y después de iniciado el tratamiento, podría estar asociada con la RO y la SLP.

A partir de estos resultados se puede concluir que el conteo absoluto de neutrófilos, evaluado después del inicio del tratamiento, podría servir como un biomarcador pronóstico de la respuesta para pacientes con CPCNP. La evaluación del conteo absoluto de plaquetas, después del inicio del tratamiento, podría servir como un biomarcador predictivo de la SLP para pacientes con CPCNP tratados con pembrolizumab en combinación con docetaxel. También, la evaluación de la frecuencia de algunas subpoblaciones de células del sistema inmune circulantes en sangre periférica, así como la abundancia en su membrana de PD-1 y PD-L1, evaluada antes y después de iniciado el tratamiento, mediante citometría de flujo, podría servir como biomarcador pronóstico y/o predictivo para pacientes con CPCNP.

# I. INTRODUCCIÓN

## CÁNCER

El cáncer es un conjunto heterogéneo de enfermedades que se originan por la acumulación de cambios moleculares que, en conjunto con la activación de oncogenes y pérdida de función de genes supresores de tumores, les permiten a las células proliferar y diseminarse de manera descontrolada. A pesar de la gran diversidad molecular y etiológica del cáncer, se han identificado algunas características moleculares, bioquímicas y celulares que son comunes en todos los tipos de cáncer humano. Originalmente se



**Ilustración 1. Alteraciones necesarias para el desarrollo del cáncer.** La evasión del ataque inmunológico, la reprogramación del metabolismo, la autosuficiencia en señales de crecimiento, la insensibilidad ante señales inhibitorias de crecimiento, la inducción de la angiogénesis, la invasión tisular y metástasis, la evasión de la muerte celular programada y el potencial replicativo ilimitado, son alteraciones de la fisiología celular que son necesarias para el desarrollo del cáncer. La inflamación crónica y la inestabilidad genómica son procesos que facilitan la adquisición de todas estas alteraciones. (Creado con BioRender).

describieron seis alteraciones en la fisiología celular que son necesarias para el desarrollo del cáncer: **1)** autosuficiencia en señales de crecimiento; **2)** insensibilidad ante señales inhibitorias de crecimiento; **3)** evasión de la muerte celular programada; **4)** potencial replicativo ilimitado; **5)** angiogénesis y; **6)** invasión tisular y metástasis. Más recientemente, se añadió a esta lista a la reprogramación del metabolismo y la evasión del ataque inmunológico, como características adicionales que se presentan en todos los tipos de cáncer humano, y a la inflamación crónica y la inestabilidad genómica como procesos que facilitan la adquisición de estas alteraciones (**Ilustración 1**) [1].

En tejidos sanos la proliferación y muerte celular están altamente controladas para mantener la homeóstasis tisular. Sin embargo, las células neoplásicas son capaces de mantener activas las señales proliferativas de manera crónica mediante cuatro principales mecanismos: **1)** estimulación autocrina con factores de crecimiento; **2)** estimulación paracrina de las células sanas que rodean el tumor para promover la liberación de factores de crecimiento; **3)** hipersensibilidad ante factores de crecimiento mediante la sobreexpresión de sus receptores y; **4)** alteraciones estructurales en los receptores de factores de crecimiento

para facilitar la señalización independiente de ligando [1]. Por otra parte, las células neoplásicas pueden adquirir insensibilidad ante señales inhibitorias del crecimiento, a través de la pérdida de función o inhibición de genes supresores de tumores como *RBI* y *TP53* [1]. Como mecanismo adicional, las células neoplásicas son capaces de evadir de la muerte celular programada mediante cuatro principales estrategias: **1)** sobreproducción de moléculas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-x<sub>1</sub>; **2)** sobreproducción de moléculas señalizadoras de supervivencia como IGF-1/2; **3)** regulación a la baja de factores proapoptóticos como Bax, Bim y PUMA y; **4)** interrupción de la vía de señalización extrínseca de muerte celular [1]. Sin embargo, para generar lesiones macroscópicas, las células deben ser capaces de pasar por un número ilimitado de divisiones celulares. Las células neoplásicas pueden evadir las barreras proliferativas de senescencia y apoptosis, mediante dos principales mecanismos: **1)** sobreexpresión de telomerasas, y **2)** mantenimiento de los telómeros mediante mecanismos de recombinación [1].

Para que la progresión del cáncer sea exitosa, es necesario que las células neoplásicas aseguren la disponibilidad de nutrientes y oxígeno para las todas las células de la lesión, así como la correcta evacuación de sus desechos metabólicos y dióxido de carbono. Por lo tanto, durante las fases tempranas de la carcinogénesis, las células neoplásicas adquieren la capacidad de promover un estado angiogénico crónico, en el que se promueve la ramificación de los vasos sanguíneos cercanos hacia el cáncer en desarrollo. Las células neoplásicas promueven la angiogénesis mediante dos mecanismos principales: **1)** sobreproducción de proteínas señalizadoras proangiogénicas como el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) y, **2)** regulación a la baja de proteínas señalizadoras antiangiogénicas como la trombospondina 1 (TSP-1) y su posterior liberación hacia las células endoteliales vasculares cercanas al tumor [1].

Sin embargo, la adquisición de las características previamente descritas, ya sea solas o en conjunto, no resultan en la generación de cáncer, cuya característica distintiva es la habilidad de llevar a cabo el proceso denominado transición epitelial-mesenquimal, la cual permite a las células neoplásicas invadir tejidos distintos al órgano de origen y hacer metástasis [2]. Las células neoplásicas desarrollan alteraciones en sus uniones con otras células y con la matriz extracelular, facilitando la migración e invasión de otros tejidos, mediante los siguientes mecanismos: **1)** regulación a la baja de moléculas de adhesión célula-célula como la E-cadherina; **2)** regulación a la baja de moléculas de adhesión célula-matriz extracelular y; **3)** sobreexpresión de moléculas de adhesión involucradas en la migración celular como la N-cadherina [1]. La cascada de invasión-metástasis, consta de las siguientes etapas: **1)** invasión local; **2)** intravasación de las células cancerosas a los vasos sanguíneos y linfáticos cercanos; **3)** circulación de las células cancerosas por los sistemas sanguíneo y linfático; **4)** extravasación del lumen de los vasos hacia los tejidos; **5)** formación de pequeños nódulos de células cancerígenas, crecimiento de los nódulos y colonización [3].

La proliferación y diseminación celular descontroladas, que representan la esencia del cáncer, requieren grandes cantidades de energía, por lo que las células neoplásicas frecuentemente realizan ajustes en su metabolismo. Incluso en presencia de oxígeno, las células neoplásicas producen su energía casi exclusivamente mediante glucólisis, compensando su baja eficiencia en cuanto a la producción de ATP comparada con la de la fosforilación oxidativa, mediante la sobreexpresión de transportadores de glucosa. El uso de la glucólisis como principal fuente de energía ha sido relacionado con la activación de oncogenes como *RAS* y *MYC* y mutaciones en genes supresores de tumores como *TP53*, las cuales son seleccionadas en las células neoplásicas principalmente por los fenotipos ventajosos en los que resultan. Adicionalmente, este estado metabólico es acentuado bajo las condiciones de hipoxia presentes en muchos tumores. Una explicación adicional para este cambio metabólico es que los intermediarios de la glucólisis pueden entrar fácilmente a otras rutas metabólicas para generar nucleósidos y aminoácidos, facilitando la biosíntesis de las macromoléculas y los organelos necesarios para la formación de nuevas células [1].

Todas las alteraciones fisiológicas, anteriormente mencionadas, que adquieren las células durante la carcinogénesis, pueden alertar al sistema inmunológico del inicio de la enfermedad. El cual, tiene el potencial de eliminar a las células neoplásicas.

## **SISTEMA INMUNE Y CÁNCER**

La noción de que el sistema inmunológico es capaz de reconocer y eliminar a las células neoplásicas fue propuesta por Paul Ehrlich hace más de un siglo [4]. Desde entonces, se tienen registros de observaciones epidemiológicas que ponen en evidencia la importancia del sistema inmunológico durante el desarrollo del cáncer. Una de estas observaciones fue que los pacientes con inmunodeficiencias y receptores de trasplantes bajo inmunosupresores tienen mayor riesgo de desarrollar algunos tipos de cáncer [5-7]. Otro escenario que ilustra el papel del sistema inmunológico en el control del cáncer es la transmisión de cáncer de un donador de un trasplante al receptor. Se han registrado varios casos en los que el trasplante parece estar libre de cáncer, sin embargo, después de algunos años del trasplante, el receptor desarrolla algún tipo de cáncer con origen en el donador, aunque el donador nunca haya tenido cáncer, tenga cáncer en un sitio anatómico distante al del órgano trasplantado o haya estado en remisión durante muchos años [8, 9]. También se observaron casos que señalaban una asociación entre la inflamación y el cáncer. Por ejemplo, **1)** la inflamación crónica pulmonar, frecuentemente observada en los fumadores, puede resultar en la carcinogénesis, progresión de la enfermedad, invasión y metástasis, independientemente de los efectos del tabaco; **2)** el 25% de las enfermedades neoplásicas están asociadas con la inflamación crónica; **3)** muchas enfermedades inflamatorias son factores de riesgo para el desarrollo de cáncer; **4)** se ha detectado la presencia de moléculas mediadoras de la inflamación dentro y alrededor del microambiente de diversos tipos de tumores; **5)** aunque su papel como quimio-profiláctico no

está bien establecido, estudios de casos y controles han mostrado que los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos disminuyen la incidencia y retrasan la progresión en pacientes con cáncer de mama, de próstata, colorrectal y de pulmón y; **6**) la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias aumenta el riesgo de cáncer y progresión de la enfermedad en modelos murinos [10, 11].

Hoy en día se sabe que la inflamación crónica facilita el desarrollo del cáncer. Sin embargo, fue hasta la década de 1990 que se obtuvo evidencia experimental convincente acerca del papel del sistema inmunológico en el cáncer, con el descubrimiento del rechazo inmunológico de trasplantes de células neoplásicas y por la demostración de que los ratones inmunodeficientes son más susceptibles a la formación de tumores [12]. Además, se observó que los pacientes con cáncer pueden producir una respuesta inmunológica específica contra sus tumores [13-15].

Actualmente es ampliamente aceptado que el sistema inmunológico funciona como un supresor tumoral extrínseco que ayuda a prevenir el cáncer. Sin embargo, el cáncer puede desarrollarse en pacientes inmunocompetentes debido a que las células cancerosas desarrollan mecanismos que les permiten evadir la acción del sistema inmunológico [1, 5, 7, 16]. Adicionalmente, si la respuesta inflamatoria necesaria para el desarrollo de la inmunidad antitumoral no es controlada, ésta puede paradójicamente promover la carcinogénesis y la progresión de la enfermedad al proveer factores de crecimiento y supervivencia, factores proangiogénicos, enzimas remodeladoras de la matriz extracelular y moléculas mutagénicas [1, 5, 7, 17]. Para poder explicar estos dos efectos contrastantes del sistema inmunológico en los tumores en desarrollo, Gavin Dunn *et. al.* propusieron en 2002 la teoría de la edición inmunológica asociada al cáncer [18]. Dicha teoría, que sigue siendo citada en la actualidad [2], se basa en un mecanismo dinámico compuesto por las etapas de eliminación, equilibrio y escape [6, 7, 18].

Durante la etapa de eliminación el sistema inmunológico innato y el adaptativo se coordinan para detectar la presencia de células neoplásicas en desarrollo y eliminarlas antes de que estas sean detectables [6, 7]. Dentro de los principales mecanismos mediante los cuales el sistema inmunológico es alertado de la carcinogénesis se encuentran las señales clásicas de daño tisular (interferones tipo I) liberadas durante la remodelación de la matriz extracelular, los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs por sus siglas en inglés) liberados por las células cancerosas al ser destruidas, y los ligandos de estrés frecuentemente expresados en la superficie de las células cancerosas [19, 20]. Frecuentemente, esta etapa resulta en la expansión de linfocitos T cooperadores y citotóxicos efectores específicos contra antígenos presentes en las células neoplásicas en desarrollo, lo que le confiere al hospedero la capacidad de eliminar a una gran cantidad de estas células [7].

Posteriormente, las células neoplásicas que logran sobrevivir a la eliminación entran en un equilibrio dinámico con el sistema inmunológico del hospedero, en el que se ejerce una presión selectiva que es suficiente

para controlar, pero no para erradicar por completo, a una lesión heterogénea que contiene una gran cantidad de células neoplásicas genéticamente inestables [6, 7]. El cáncer en desarrollo puede mantenerse en la etapa de equilibrio durante toda la vida del hospedero, ya que las células neoplásicas pueden entrar en un estado de quiescencia o de proliferación lenta y mantenerse latentes por mucho tiempo [21]. Sin embargo, esta etapa frecuentemente finaliza cuando surge una nueva población de células cancerosas cuya inmunogenicidad reducida les permite evadir la acción del sistema inmunológico, por lo que se dice que esta etapa opera bajo las reglas de la selección darwiniana [7].

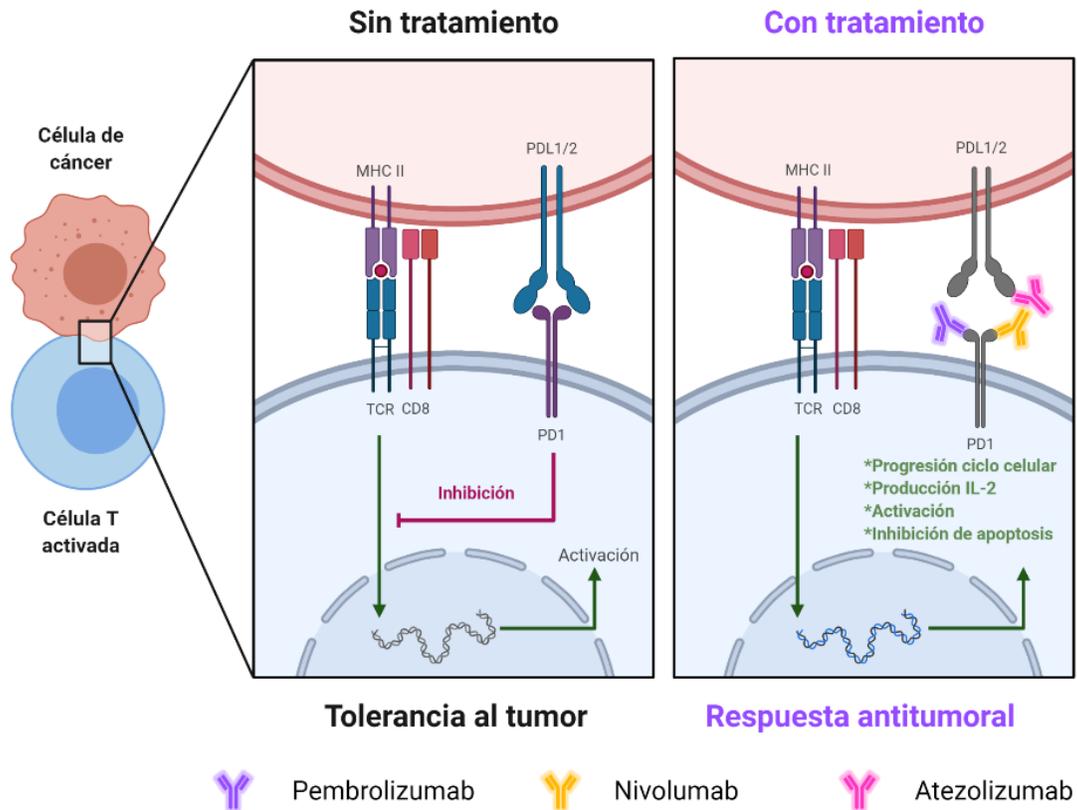
De esta manera, las células neoplásicas que fueron seleccionadas durante la etapa de equilibrio ahora pueden proliferar libremente, debido a que su fenotipo les permite evadir el reconocimiento y ataque del sistema inmunológico, permitiendo su expansión hasta hacerse clínicamente detectables [6, 7, 22]. Las células neoplásicas pueden evadir las repuestas inmunológicas antitumorales mediante diversos mecanismos, pero de manera general pueden clasificarse dentro de cuatro grandes grupos: **1)** regulación a la baja de moléculas involucradas en el procesamiento y presentación antigénica como la pérdida de antígenos o componentes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés), **2)** regulación a la baja de moléculas involucradas en la activación del sistema inmunológico como interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) e IL-12, **3)** reclutamiento de células regulatorias del sistema inmunológico, y **4)** regulación a la alta de moléculas involucradas en la supresión de la respuesta inmune antitumoral, como las moléculas co-inhibitorias proteína 4 asociada al linfocito T citotóxico (CTLA-4), proteína 1 de la muerte celular programada (PD-1) y ligando de la proteína 1 de la muerte celular programada (PD-L1) [23-25].

El estudio de moléculas co-inhibitorias como CTLA-4, PD-1 y PD-L1, ha permitido el desarrollo de terapias dirigidas que, al bloquear la unión de dichas moléculas con sus ligandos, evitan la supresión de la respuesta inmune antitumoral, tal como las inmunoterapias basadas en inhibidores de puntos de control inmunológico (ICIs) [26].

## **PUNTOS DE CONTROL INMUNOLÓGICO Y SU PAPEL EN EL CÁNCER**

La actividad del sistema inmunológico se regula por varias señales estimuladoras e inhibitorias, las cuales en conjunto son llamadas puntos de control inmunológico [27]. Las inmunoterapias basadas en ICIs se fundamentan en que la supresión de la respuesta inmune antitumoral está regulada, en parte, por puntos de control inmunológico inhibitorios. Donde la interacción entre los puntos de control inmunológico y sus ligandos es compleja y puede ocurrir en diferentes etapas de la activación y función de las células del sistema inmunológico que los expresan. Por ejemplo, los receptores de membrana CTLA-4, receptor celular 2 del virus de la hepatitis A (TIM-3), gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3) e inmunoreceptor de células T con dominios Ig e ITIM (TIGIT) interactúan con sus ligandos principalmente durante la presentación antigénica,

limitando así la activación de los linfocitos T. Por otro lado, PD-1 se expresa en las células inmunes ya activadas y la interacción con sus ligandos PD-L1 y PD-L2 activa una cascada de señales intracelulares que previenen la fase efectora [28, 29], la cual involucra la eliminación del agente patógeno (**Ilustración 2, izquierda**).



**Ilustración 2. Vía de señalización PD-1/PD-L1.** En el panel izquierdo se muestra que la interacción entre PD-1 y sus ligandos PD-L1/2, desencadena una cascada de señalización intracelular, que culmina en la inhibición de la fase efectora de las células T. En el panel derecho se muestra que el bloqueo con anticuerpos monoclonales de la interacción entre PD-1 y sus ligandos PD-L1/2 reestablece las funciones efectoras de las células T. (Creado con BioRender).

Existen dos vías de puntos de control inmunológico cuyo bloqueo con ICIs ha resultado en un beneficio clínico para pacientes con diferentes tipos de cáncer. La primera vía es la del antígeno CTLA-4, que se encuentra en la membrana de los linfocitos T citotóxicos y evita que estos sean activados por las células dendríticas en los nódulos linfáticos, limitando la autoinmunidad. La segunda vía es la de PD-1, que también es un inhibidor inmunológico y se localiza en la superficie celular de los linfocitos T, linfocitos B, células NK y células dendríticas. La actividad de estas células del sistema inmunológico es regulada a la baja cuando PD-1 se une a sus ligandos (PD-L1 y PD-L2). La proteína PD-L1 se expresa en muchos tipos celulares y tejidos como músculo, células pancreáticas, placenta, células troncales mesenquimatosas, linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas, macrófagos y mastocitos, lo que protege a los tejidos de la autoinmunidad. [27, 29, 30].

La sobreexpresión de PD-L1 ha sido identificada en muchos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), donde esta sobreexpresión constituye un escudo que les permite a las células neoplásicas evadir el ataque por parte del sistema inmunológico y, por lo tanto, sobrevivir. Lo cual da como resultado la eventual progresión de la enfermedad. El bloqueo de estas vías inhibitorias con ICIs, como el pembrolizumab, nivolumab o atezolizumab, puede restablecer la actividad antitumoral del sistema inmunológico, y ha surgido como una estrategia terapéutica exitosa para muchos tipos de cáncer, incluyendo el CPCNP [27, 29, 30] (**Ilustración 2, derecha**).

## TERAPIAS DIRIGIDAS PARA CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer de pulmón es la segunda neoplasia con mayor incidencia y la primera con la mayor mortalidad en el mundo [31]. En México, aunque ocupa la séptima posición en la lista de incidencia de cáncer por sitio, es la cuarta enfermedad neoplásica con la mayor mortalidad asociada [32]. Esto hace que el cáncer de pulmón sea considerado un problema grave de salud pública en nuestro país [33].

El cáncer de pulmón se divide, según su histología, en CPCNP y cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP). La etiología, pronóstico y aproximación terapéutica de ambas categorías es distinta. Alrededor del 85% de los casos de cáncer de pulmón son de tipo CPCNP, el cual a su vez se subdivide en adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes [34].

A pesar de los avances tecnológicos y de las nuevas técnicas de diagnóstico, en México el 99% de los pacientes con CPCNP son diagnosticados con estadios avanzados de la enfermedad (IIIB-IV), lo que contribuye a su pobre pronóstico [29, 33]. Gracias a la introducción de terapias dirigidas como el gefitinib, el cual es un inhibidor de la tirosina cinasa (TKI) del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), a finales de los noventa se logró mejorar el pronóstico clínico en aquellos pacientes con CPCNP con alteraciones activadoras en el gen *EGFR* [35, 36]. Posteriormente, se desarrollaron terapias dirigidas contra alteraciones en otros genes como *ALK*, *ROS1* y *BRAF*, con las cuales se logró obtener una mejor tasa de respuesta, así como una supervivencia más prolongada que con las terapias sistémicas, en aquellos pacientes con alteraciones en alguno de estos genes [37-39]. Sin embargo, el tratamiento estándar para pacientes con CPCNP en estadios avanzados y sin alteraciones moleculares en *EGFR*, *ALK*, *ROS1* o *BRAF* seguía siendo la quimioterapia basada en platino (cisplatino o carboplatino) como terapia de primera línea, y monoterapia con docetaxel (DTX) en la segunda línea [40].

El DTX es un tratamiento sistémico que interfiere con la división celular al inhibir la formación de los microtúbulos necesarios para la mitosis. Al igual que la quimioterapia basada en platinos, el tratamiento con DTX presenta múltiples desventajas, como una alta toxicidad sistémica y el desarrollo de resistencia y eventual progresión de la enfermedad [41]. De manera que, estos tratamientos citotóxicos sistémicos sólo han traído

ligeros beneficios en términos de supervivencia para los pacientes de CPCNP. Consecuentemente, fue necesario aumentar los esfuerzos para desarrollar terapias dirigidas que pudieran beneficiar a aquellos pacientes sin alteraciones en genes específicos.

La introducción de las inmunoterapias basadas en ICIs, como los anticuerpos monoclonales dirigidos contra CTLA-4 o contra PD-1/PD-L1, ha revolucionado el tratamiento los pacientes con CPCNP. El primer ICI en el mundo en ser aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes con cáncer fue ipilimumab, el cual es un anticuerpo monoclonal que bloquea al receptor CTLA-4 y es utilizado para el tratamiento del melanoma. En el 2015 la FDA aprobó el uso del anticuerpo monoclonal nivolumab, el cual bloquea al receptor PD-1, para el tratamiento de segunda línea de pacientes con CPCNP. Al año siguiente el anticuerpo monoclonal pembrolizumab, el cual también bloquea al receptor PD-1, se convirtió en el nuevo estándar de tratamiento de primera línea en pacientes con CPCNP con una expresión tumoral de PD-L1  $\geq 50\%$  [40]. Por último, en el 2018 se estableció a la quimioterapia basada en platinos en combinación con pembrolizumab como una opción más de tratamiento de primera línea para pacientes con CPCNP con estadios avanzados sin importar la expresión tumoral de PD-L1 [42, 43] (**Ilustración 3**).



**Ilustración 3. Línea del tiempo de la introducción de terapias dirigidas en CPCNP.** En la línea del tiempo se muestran algunos de los sucesos más importantes que han revolucionado el tratamiento de los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas. CPCNP: cáncer de pulmón de células no pequeñas; EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; PD-L1; ligando de la proteína 1 de la muerte celular programada.

## ICIS CONTRA CPCNP

Actualmente tres ICIs están aprobados para el tratamiento de pacientes con CPCNP en estadios avanzados en Estados Unidos, la Unión Europea y Japón. Dos de ellos son los anticuerpos monoclonales anti-PD-1, pembrolizumab y nivolumab, fabricados por las farmacéuticas Merck y Bristol-Myers Squibb respectivamente; el tercero es el anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 atezolizumab fabricado por la farmacéutica Genentech [27].

El ensayo clínico KEYNOTE-024, demostró que con el tratamiento de primera línea con pembrolizumab se obtiene una sobrevida, tanto global como libre de progresión, más larga; así como menos efectos adversos que con la quimioterapia basada en platino en pacientes con CPCNP, sin alteraciones en los oncogenes *EGFR*, *ALK*, *ROS1* o *BRAF* y con abundancia de PD-L1  $\geq 50\%$  en tejido tumoral, evaluado mediante inmunohistoquímica [44]. Con base en estos resultados, el pembrolizumab se convirtió en el tratamiento estándar de primera línea para estos pacientes.

Tras la realización de diferentes ensayos clínicos para evaluar la eficacia de pembrolizumab, nivolumab y atezolizumab en pacientes con CPCNP en estadios avanzados que progresaron al tratamiento de primera línea. El tratamiento con cada uno de estos agentes inmunoterapéuticos se convirtió en una nueva opción de tratamiento para estos pacientes. En el ensayo clínico KEYNOTE-001 se observó una asociación entre la abundancia de PD-L1 en tejido tumoral con la duración de la sobrevida libre de progresión y la tasa de respuesta a la terapia con pembrolizumab [45]. Por ello, actualmente el tratamiento en segunda línea con pembrolizumab para CPCNP solo está indicado para aquellos pacientes que no tienen alteraciones moleculares en los oncogenes *EGFR*, *ALK*, *ROS1* o *BRAF*, y cuya abundancia de PD-L1 en tejido tumoral es mayor o igual a 1% [41].

Con base en los resultados de estos ensayos clínicos, ahora es utilizada la evaluación de la abundancia de PD-L1, mediante inmunohistoquímica en tejido tumoral, para seleccionar pacientes con CPCNP para ser tratados con pembrolizumab ( $\geq 50\%$  para tratamiento de primera línea y  $\geq 1\%$  para tratamiento de segunda línea). Adicionalmente, la abundancia elevada de PD-L1 en tejido tumoral es un factor pronóstico negativo en diferentes tipos de cáncer, pero para el CPCNP esto es incierto debido a que en algunos casos la sobreproducción de PD-L1 parece estar relacionada con una sobrevida global más prolongada [46]; en otros casos parece no tener relación alguna con el pronóstico [47]; aunque en la mayoría de los estudios se presenta como un marcador de pronóstico negativo [46, 48]. De igual forma, ha sido difícil llegar a un consenso en cuanto a su valor predictivo de respuesta a los ICIs dirigidos contra PD-1/PD-L1 en CPCNP, debido a que las tasas de respuesta de los pacientes que son elegidos para recibir estas terapias bajo criterios basados en la abundancia de PD-L1 en tejido tumoral se encuentran entre el 20% y 50%, además se ha reportado un número significativo de pacientes cuyas células neoplásicas no expresan PD-L1 y responden a la terapia [27, 30]. Por

ello, el porcentaje de abundancia de PD-L1 en tejido tumoral está aún lejos de ser un buen biomarcador de pronóstico y respuesta a ICIs para pacientes con CPCNP.

## **BIOMARCADORES EN PACIENTES CON CPCNP TRATADOS CON ICIS**

La identificación de biomarcadores más precisos para seleccionar a pacientes que pueden beneficiarse de las terapias con ICIs, dirigidos contra PD-1/PD-L1, es fundamental para mejorar los resultados obtenidos con estas terapias. El hecho de que las terapias de bloqueo de PD-1/PD-L1 producen respuestas duraderas en un grupo limitado de pacientes con CPCNP, además de que todos los pacientes que las reciben están en riesgo de desarrollar efectos adversos relacionados al tratamiento, y el elevado costo de estas terapias; hace aún más evidente la necesidad de que la elección de los pacientes con mayor probabilidad de obtener un beneficio clínico sea precisa.

Actualmente existen muchos conflictos en cuanto al valor predictivo y pronóstico de la evaluación de la abundancia de PD-L1 en tejido tumoral de pacientes con CPCNP. Esto se debe a que la producción de PD-L1 es dinámica y heterogénea, por lo que la evaluación del porcentaje de PD-L1 en una biopsia sólo representa una pequeña porción del tumor en un momento determinado [27, 30].

La evaluación de la carga mutacional tumoral (TMB por sus siglas en inglés), definida como el número de mutaciones somáticas por mega base en una secuencia genómica determinada [49], surgió como una estrategia adicional para seleccionar a los pacientes con mayor probabilidad de obtener un beneficio clínico ante el tratamiento con ICIs y se ha observado que una alto TMB está asociado con un mayor beneficio clínico derivado del tratamiento con ICIs en pacientes con CPCNP, mientras que aquellos pacientes con TMB alta que no son tratados con ICIs tienen un pronóstico pobre [50, 51]. Aunque el TMB parece tener un gran valor como biomarcador pronóstico, se sabe que existen otras características moleculares que influyen la probabilidad de que un paciente obtenga un beneficio clínico del tratamiento con ICIs.

Es cierto que durante la edición inmunológica asociada al cáncer ocurren cambios locales en el sitio de la lesión neoplásica, sin embargo, ésta se alcanza mediante cambios sistémicos. Tanto en los tejidos tumorales como en los compartimentos circulatorios se encuentran presentes dos componentes contrastantes del sistema inmunológico, el efector y el supresor, que generan efectos opuestos durante el desarrollo del cáncer. Los componentes del sistema inmunológico que operan a nivel local en los tejidos tumorales también se encuentran presentes en la sangre [52]. Los biomarcadores circulantes en sangre periférica podrían ser indicadores de un panorama más completo, además de que su obtención es menos costosa e invasiva que la obtención de una biopsia de pulmón. Por ello, se están estudiando diversos parámetros hematológicos para determinar su valor predictivo en cuanto al beneficio clínico que obtienen los pacientes del tratamiento con ICIs.

## II. ANTECEDENTES

---

El ensayo clínico KEYNOTE-189 demostró que al combinar quimioterapia con inmunoterapia se obtienen mejores resultados que con quimioterapia en monoterapia, como tratamiento de primera línea para pacientes con CPCNP con estadios avanzados, independientemente de la expresión de PD-L1 en tejido tumoral [42].

El ensayo clínico PROLUNG, realizado en pacientes con CPCNP en estadios avanzados, demostró que con la terapia de segunda línea de pembrolizumab combinada con DTX se logra una tasa de respuesta más elevada, así como una supervivencia libre de progresión más prolongada que con la monoterapia con DTX, independientemente de la abundancia de PD-L1 en tejido tumoral [53]. Sin embargo, en este ensayo no se evaluaron posibles biomarcadores que pudieran ayudar a seleccionar a aquellos pacientes con mayor probabilidad de obtener un beneficio clínico de estos tratamientos.

Diferentes estudios han relacionado diferentes parámetros hematológicos con la respuesta al tratamiento de segunda línea con nivolumab en pacientes con CPCNP con estadios avanzados. Uno de ellos concluyó que el bajo conteo absoluto de neutrófilos y alto conteo absoluto de linfocitos y eosinófilos antes de iniciar el tratamiento están con una mayor supervivencia, tanto global como libre de progresión [54]. Otro estudio concluyó que existe una relación entre altos niveles de células NK y bajos niveles de leucocitos y neutrófilos, así como una razón neutrófilos/linfocitos baja antes de iniciar el tratamiento con una supervivencia libre de progresión más prolongada. Este mismo estudio concluyó que existe una relación entre bajos niveles de leucocitos y neutrófilos, así como una razón neutrófilos/linfocitos bajo antes de iniciar el tratamiento con una mayor supervivencia global en estos mismos pacientes [55].

Barrera, L. *et. al.* (2018) se enfocaron en la evaluación de parámetros hematológicos, así como diferentes componentes del sistema inmunológico en sangre periférica de pacientes con CPCNP como potenciales biomarcadores de pronóstico. Su estudio concluyó que un elevado número de leucocitos, neutrófilos y plaquetas, y bajos niveles de albúmina y hemoglobina, así como una razón plaquetas/linfocitos y neutrófilos/linfocitos elevada, en sangre periférica de pacientes con CPCNP, bajo tratamiento de primera línea con quimioterapia basada en platino, están asociados a una supervivencia global más corta. Este mismo estudio concluyó que bajos niveles de un subtipo de células mieloides supresoras, así como bajos niveles de IL-1 $\beta$  e IL-27 y altos niveles de IL-29 están asociados a una supervivencia global más larga en estos de pacientes [56].

Recientemente, Mazzaschi, G., *et. al.* (2019) concluyeron que los niveles en sangre periférica de células NK, junto con los de linfocitos T citotóxicos que producen PD-1, previos al tratamiento, se encuentran asociados con la respuesta al tratamiento, la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global, en pacientes con CPCNP con estadios avanzados tratados con nivolumab [52]. Lo cual apoya la idea de que la cuantificación de células de del sistema inmunológico en sangre periférica, así como su producción PD-1

podría ser una estrategia viable para predecir el pronóstico y la respuesta a las terapias anti-PD-1 en este tipo de pacientes.

Arrieta, O., *et. al.* (2017) demostraron que la sobreproducción de PD-1 y PD-L1 en células mononucleares de sangre periférica, particularmente en linfocitos T, está relacionada con una menor supervivencia global en pacientes con CPCNP con estadios avanzados bajo tratamiento de primera línea con quimioterapia basada en platino, pemetrexed o TKI, lo que apoya la idea de que esto podría ser un mecanismo adicional que le permite a las células cancerosas escapar de la acción del sistema inmunológico. Este mismo estudio también sugiere que evaluar la abundancia de PD-1 y PD-L1 en células inmunes circulantes en sangre periférica podría servir como biomarcador de pronóstico y predictivo en estos pacientes [57].

Todos estos resultados sugieren que algunos parámetros hematológicos, así como la abundancia en sangre periférica de diferentes poblaciones de células del sistema inmunológico, junto con sus niveles de producción de PD-1 y PD-L1, podrían estar asociados con la respuesta y duración de la supervivencia libre de progresión en pacientes con CPCNP, bajo tratamiento de segunda línea con quimioterapia combinada con pembrolizumab o con monoterapia con quimioterapia. De manera que, estos parámetros podrían funcionar como biomarcadores, alternativos a la abundancia tumoral de PD-L1, para seleccionar a aquellos pacientes con mayor probabilidad de obtener un beneficio clínico de estos tratamientos.

### III. OBJETIVOS

---

#### OBJETIVO GENERAL

Conocer el valor pronóstico, predictivo o de monitoreo de la determinación de la frecuencia de diferentes poblaciones de células del sistema inmune circulantes en sangre periférica, así como de la abundancia en su membrana de PD-1 y PD-L1, además de la concentración de albúmina y antígeno carcinoembrionario (ACE) en sangre, en pacientes con CPCNP en estadios avanzados tratados con pembrolizumab en combinación con DTX (grupo experimental) en comparación con DTX en monoterapia (grupo control).

#### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar la frecuencia de diferentes poblaciones de células del sistema inmune en sangre periférica de los pacientes mediante biometría hemática y/o tinción de inmunofluorescencia extracelular por citometría de flujo.
2. Conocer la abundancia de PD-1 y PD-L1 en cada una de las poblaciones celulares inmunes identificadas en los pacientes.
3. Conocer el beneficio clínico que obtienen los pacientes con base en los siguientes criterios de valoración: respuesta objetiva y duración de la supervivencia libre de progresión.
4. Evaluar si existe una asociación entre los niveles de diferentes poblaciones celulares del sistema inmune en sangre periférica de los pacientes con la respuesta al tratamiento asignado (pembrolizumab en combinación con DTX o DTX como monoterapia) y la duración de la supervivencia libre de progresión.
5. Evaluar si existe una asociación entre la abundancia de PD-1 y PD-L1 en cada una de las poblaciones celulares inmunes de los pacientes con la respuesta al tratamiento asignado (pembrolizumab en combinación con DTX o DTX como monoterapia) y la duración de la supervivencia libre de progresión.

## **IV. HIPÓTESIS**

---

La frecuencia de diferentes poblaciones de células del sistema inmunológico circulantes en sangre periférica, así como la abundancia en su membrana de PD-1 y PD-L1, y la concentración de albúmina y ACE en sangre periférica se encuentran asociadas a la respuesta objetiva y/o duración de la supervivencia libre de progresión de los pacientes de CPCNP tratados con pembrolizumab y/o DTX. Por lo que la evaluación de estos factores podría servir como un biomarcador pronóstico, predictivo y/o de monitoreo.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un subanálisis retrospectivo del ensayo clínico PROLUNG registrado en ClinicalTrials.gov con el código de identificación NCT02574598. PROLUNG es un ensayo clínico fase 2, aleatorizado y, abierto en el que 78 pacientes confirmados histológicamente con CPCNP en estadio avanzado (IIIB-IV según el sistema TNM) fueron asignados de manera aleatoria, en una razón 1:1, para recibir como tratamiento de segunda línea pembrolizumab en combinación con DTX, o bien, DTX en monoterapia desde diciembre del 2016 hasta noviembre del 2019 en el Instituto Nacional de Cancerología. Para este subanálisis se incluyeron 46 pacientes del ensayo clínico PROLUNG, 24 del grupo experimental, tratados con pembrolizumab en combinación con DTX, y 22 del grupo control, tratados únicamente con DTX.

### SUJETOS DE ESTUDIO

#### Criterios de inclusión

Pacientes de al menos 18 años diagnosticados histológicamente con CPCNP metastásico, con enfermedad medible de acuerdo con los criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos versión 1.1 (RECIST 1.1) y estatus funcional de entre 0 y 2 de acuerdo con la escala del grupo cooperativo de oncología del este (ECOG). Los pacientes deben haber presentado progresión de la enfermedad después del tratamiento de primera línea con quimioterapia basada en platino. Antes de la aleatorización los pacientes deben contar con un análisis de laboratorio de biometría hemática con valores aceptables para pacientes con CPCNP con estadios avanzados. Los pacientes deben haber firmado la forma de consentimiento informado escrita aprobada por el comité de bioética del Instituto Nacional de Cancerología con el número de referencia INCAN/CI/1210/18.

#### Criterios de exclusión

Para asegurar que los pacientes vivan el tiempo suficiente para recibir al menos cuatro ciclos de tratamiento, se excluyó a aquellos con metástasis activas del sistema nervioso central. Con el fin de evitar que los resultados estén sesgados por otras afectaciones o tratamientos anteriores, se excluyó a aquellos pacientes con enfermedades autoinmunes y pacientes en tratamiento con medicamentos inmunosupresores o inmunoestimulantes.

## Criterios de eliminación

Pacientes que retiren su consentimiento o que presenten toxicidad inaceptable al tratamiento asignado.

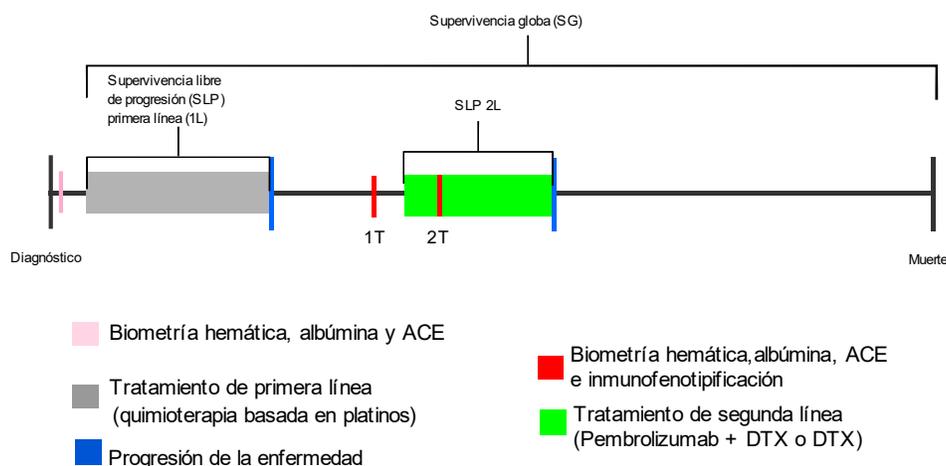
## METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### Obtención de características clínicas basales y datos hematológicos

A través del expediente electrónico INCANET se recolectaron retrospectivamente los datos clínico-patológicos de cada paciente correspondientes a: **a)** sexo; **b)** edad; **c)** historial de tabaquismo; **d)** historial de exposición a humo de leña; **e)** ECOG; **f)** histología; **g)** perfil mutacional; **h)** estatus tumoral de PD-L1; **i)** respuesta al tratamiento de segunda línea y; **j)** supervivencia libre de progresión bajo el tratamiento de segunda línea; así como los valores correspondientes al conteo absoluto de plaquetas, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos de los análisis de biometría hemática, cuantificación de albúmina y cuantificación de ACE al momento del **1)** diagnóstico (Dx), **2)** antes de iniciar el tratamiento asignado (1T) y **3)** después del cuarto ciclo del tratamiento asignado (2T) (**Ilustración 4**).

### Obtención de muestras de sangre periférica para la inmunofenotipificación

Se colectaron 8 ml de sangre periférica provenientes de cada paciente en tubos recubiertos con heparina (BD Biosciences). La sangre se recolectó antes de iniciar el tratamiento asignado (1T) y después del cuarto ciclo de tratamiento (2T) (**Ilustración 4**).



**Ilustración 4. Línea del tiempo de muestreo en los pacientes.** Del expediente electrónico de cada paciente se recolectaron, retrospectivamente, los datos correspondientes a biometría hemática y cuantificación de albúmina y ACE, al momento del diagnóstico, antes de iniciar el tratamiento de segunda línea (1T) y al terminar el cuarto ciclo de tratamiento de segunda línea (2T). Se recolectaron, prospectivamente, muestras de sangre de cada paciente al momento 1T y 2T, para realizar la inmunofenotipificación. Se calculó la supervivencia libre de progresión, del tratamiento de segunda línea, del inicio del tratamiento de segunda línea a la progresión de la enfermedad. ACE; antígeno carcinoembrionario; DTX: docetaxel.

## **Aislamiento de células polimorfonucleares y mononucleares a partir de sangre periférica**

Se aislaron las células polimorfonucleares y mononucleares a partir de las muestras de sangre periférica mediante un gradiente de densidades con Polymorphprep™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El Polymorphprep™ es una solución que, debido a su alta osmolalidad, provoca que se deshidraten los eritrocitos y se sedimenten al fondo del tubo, formando un gradiente de densidades que provoca la separación de las células mononucleares y las polimorfonucleares de los demás componentes de la muestra. Brevemente, se agitaron los tubos con sangre para homogeneizar y se recuperó la sangre completa en un tubo cónico de 15 ml. Se diluyó la sangre en una proporción 1:1 con buffer salino de fosfatos (PBS por sus siglas en inglés). Se colocó cuidadosamente el mismo volumen de Polymorphprep™ que el volumen obtenido en el paso anterior, dividido en 2 tubos cónicos de 15 ml en el fondo del tubo. Con extremo cuidado se depositó por la pared de cada tubo la mitad del volumen de Sangre:PBS (1:1) en cada tubo con Polymorphprep™. Se centrifugaron los tubos a temperatura ambiente (18-20°C) a 1800 rpm durante 30 minutos. Se recuperó la mayor cantidad posible de células polimorfonucleares y mononucleares de la interfaz con ayuda de una micropipeta, sin agitar la capa de eritrocitos localizada al fondo del tubo, y se transfirieron a un tubo cónico limpio de 15 ml. Se adicionó PBS a todos los tubos con células hasta llevar el contenido a un volumen de 12 ml, se centrifugaron a temperatura ambiente a 1500 rpm durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante de manera adecuada.

## **Criopreservación de células polimorfonucleares y mononucleares a partir de sangre periférica**

Se resuspendió el botón de células obtenido en el procedimiento anterior en 5400 µL de suero fetal bovino y 600 µL de dimetilsulfóxido. Se alicuotó 1 ml de la suspensión con las células por criovial y se colocó cada criovial dentro de un recipiente de congelación CoolCell™ (Corning) para conseguir una velocidad de refrigeración de -1°C/min, el cual se almacenó a -80°C hasta su uso.

## **Descongelación de células previamente criopreservadas**

Se colocaron los crioviales con células congeladas en una gradilla flotante y se calentaron a baño María a 37°C hasta descongelar. Se resuspendieron las células en 1.5 ml de medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino estéril por cada ml de células descongeladas en un tubo cónico de 15 ml. Se centrifugaron los tubos a 1500 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante de manera adecuada y se resuspendió el botón de células en 1 ml de PBS.

## **Ensayo de viabilidad celular en contador automático TC20**

Se colocaron 10  $\mu$ l de las células resuspendidas en PBS, obtenidas en el procedimiento anterior, en un tubo de microcentrífuga. Se agregaron 10  $\mu$ l de azul tripano al tubo de microcentrífuga y se resuspendió con ayuda de una micropipeta. El azul de tripano es un colorante que permite diferenciar a las células vivas de las células muertas, ya que las células vivas no incorporan el azul de tripano debido a la selectividad de su membrana, por el contrario, las células muertas sí se colorean. Se tomaron 10  $\mu$ l de la mezcla de células y azul de tripano y se depositaron en la placa del contador automático TC20<sup>TM</sup> (Bio-Rad). Se registró la cuenta de células totales y de células vivas, así como el porcentaje de viabilidad.

## **Tinción de inmunofluorescencia extracelular de células mononucleares y polimorfonucleares**

Para poder distinguir, mediante citometría de flujo a las células vivas de las células muertas, se diluyó 1  $\mu$ l de Zombie Violet (BioLegend) resuspendido en 100  $\mu$ l de PBS y a cada tubo cónico se le agregaron 100  $\mu$ l de Zombie Violet por cada  $1 \times 10^6$  células vivas. El Zombie Violet es un colorante fluorescente no permeable en células vivas, pero permeable en células muertas. Posteriormente se incubaron las células a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, a cada tubo se le agregaron 2 ml de Cell Staining Buffer (BioLegend) y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. El botón de células se resuspendió en 1 ml de Cell Staining Buffer. Se alicuotaron 140  $\mu$ l de células en un tubo de microcentrífuga por cada tubo del panel de tinción y a cada tubo se le añadieron 5  $\mu$ l de Human TruStain FcX (BioLegend). Se incubaron las células a temperatura ambiente protegidas de la luz durante 10 minutos. Se preparó en un tubo de microcentrífuga el coctel de anticuerpos conjugados a fluorocromo de acuerdo con la concentración óptima obtenida previamente en la titulación de cada uno de los anticuerpos (2.5  $\mu$ l) según el panel de tinción (**Tabla A 1**). Se añadieron los anticuerpos del panel correspondientes a cada tubo y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos protegidos de la luz. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se añadió 1 ml de Cell Staining Buffer (BioLegend) y se centrifugó a 1600 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante por decantación y se desechó de manera adecuada. Se resuspendió el botón nuevamente en 1 ml de Cell Staining Buffer (BioLegend) y se centrifugó a 1600 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante por decantación y se desechó de manera adecuada. Se resuspendió el botón en 500  $\mu$ l de Cell Staining Buffer (BioLegend) y se analizó en el citómetro de flujo.

## **CRITERIOS DE VALORACIÓN**

### **Respuesta objetiva (RO)**

Los pacientes se estratificaron en dos grupos (no respondedores y respondedores) de acuerdo con la máxima respuesta bajo el tratamiento de segunda línea, reportada por un médico oncólogo, la cual se evaluó a las 9 semanas de iniciar el tratamiento y posteriormente cada 6 semanas con base en los criterios RECIST 1.1 y se reportó en el expediente clínico de cada paciente. En el grupo de pacientes respondedores (R) se incluyeron aquellos pacientes que mostraron respuesta completa o parcial al tratamiento asignado. En el grupo de pacientes no respondedores (NR) se incluyeron aquellos pacientes que mostraron enfermedad estable o progresión de la enfermedad.

### **Supervivencia libre de progresión**

La supervivencia libre de progresión (SLP) se definió como el tiempo en meses transcurrido entre el inicio de la terapia de segunda línea y la progresión de la enfermedad. Los pacientes se estratificaron en dos grupos (SLP corta y SLP larga), utilizando como punto de corte la media reportada para cada grupo en el ensayo clínico PROLUNG, las cuales corresponden a 9.5 meses para el grupo experimental y 3.9 meses para el grupo control.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las variables continuas corresponden a media aritmética, desviación estándar, mediana y mínimo-máximo, las variables categóricas se comprendieron en proporciones.

Las comparaciones diferenciales entre grupos se realizaron mediante la prueba de Mann-Whitney y las pruebas diferenciales entre muestras subsecuentes del mismo grupo se realizaron mediante la prueba de Wilcoxon ya que los datos mostraron una distribución no normal, determinado a partir de la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se determinó como estadísticamente significativo al valor de probabilidad menor o igual a 0.05 ( $p \leq 0.05$ ).

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 ( $p \leq 0.05$ ), con un diseño de dos colas.

La supervivencia libre de progresión se calculó mediante el método de Kaplan-Meier, en las que las comparaciones entre los grupos se realizaron a través de la prueba Log Rank.

El valor predictivo de las variables con diferencias significativas entre los grupos de comparación se determinó mediante análisis de regresión logística univariado para los eventos categóricos y mediante un

análisis de regresión de Cox para los eventos continuos. Se determinó como estadísticamente significativo al valor de probabilidad menor o igual a 0.05 ( $p \leq 0.05$ ) y las variables significativamente asociadas con los eventos se introdujeron en análisis multivariados para determinar su independencia.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa de software SPSS versión 25 (SPSS, Inc. Chicago, IL, USA)

## VI. RESULTADOS

---

### CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES

De los 46 pacientes incluidos en este subanálisis, 29 (63%) fueron mujeres, 28 (60.9%) fueron diagnosticados a una edad  $\leq 60$  años, 25 (54.3%) no tuvieron historial de tabaquismo, 32 (69.6%) no tuvieron historial de exposición a humo de leña, 44 (95.7%) tuvieron un ECOG al diagnóstico igual o menor a 1, el diagnóstico histológico más frecuente fue adenocarcinoma, correspondiendo a 41 (89.1%) pacientes. Dentro del grupo de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma, la subhistología más frecuente fue acinar/papilar, correspondiendo a 19 (46.3%) pacientes. En este subanálisis se incluyó un total de 2 (4.3%) pacientes con diagnóstico positivo para variación del gen *ALK* y 15 (32.6%) pacientes con diagnóstico positivo para variación del gen *EGFR*, detectadas mediante RT-qPCR. La variación más frecuente del gen *EGFR* fue la delección del exón 19, correspondiendo a 11 (73.3%) pacientes. La media de ACE en suero al diagnóstico fue de 49.46 ng/ml y la mediana de 7.85 ng/ml. Este subanálisis incluyó un total de 12 (26.1%) pacientes con diagnóstico positivo para PD-L1 en tejido tumoral, detectado mediante inmunohistoquímica, de los cuales 9 (91.7%) fueron diagnosticados con una abundancia baja. Después de la división de los pacientes por grupo de tratamiento, 24 de ellos pertenecieron al grupo experimental que recibió pembrolizumab en combinación con DTX y 22 al grupo control que recibió DTX en monoterapia. No hubo diferencias significativas con respecto a las características clínicas basales entre los dos grupos de tratamiento ( $p > 0.05$ ) (**Tabla 1**). Con la excepción de la concentración de albúmina (3.95 vs 4.2,  $p = 0.0001$ ), tampoco se encontraron diferencias en cuanto a las características hematológicas basales entre los grupos experimental y control ( $p > 0.05$ ) (**Tabla 2**, **Tabla 3**, **Tabla 4**). Demostrando que, al igual que en el ensayo clínico PROLUNG, los diferentes grupos de tratamiento estuvieron bien balanceados.

Se realizó un análisis de supervivencia libre de progresión mediante el método de Kaplan-Meier, en el que se graficó al grupo control vs el grupo experimental. De manera similar al el ensayo clínico PROLUNG, se obtuvieron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia libre de progresión de los diferentes grupos de tratamiento con una media de 3.647 meses para el grupo control (IC 95% = 2.529-4.764) y de 12.156 meses para el grupo experimental (IC 95% = 6.308-18.004) (HR=0.20; IC 95% = 0.097-0.412;  $p < 0.001$ ) (**Ilustración 5**). Mostrando un comportamiento similar al reportado en el ensayo clínico PROLUNG (3.9 vs 9.5; HR=0.24;  $p < 0.001$ ), lo cual confirma la representatividad de la muestra.

**Tabla 1. Características clínicas de los pacientes**

Variable	Total	Pembrolizumab + DTX	DTX	P
	% (n/46)	% (n/24)	% (n/22)	
<b>Sexo</b>				
Femenino	63 (29/46)	54.2 (13/24)	72.2 (16/22)	0.193
Masculino	37 (17/46)	45.8 (11/24)	27.3 (6/22)	
<b>Edad al Dx (años)</b>				
Media ± SD	56.28 ± 13.091	54.88 ± 13.079	57.82 ± 13.233	0.452
Mediana (rango)	57 (31 - 80)	55.5 (33 - 80)	60.50 (31 - 80)	0.355
<b>Grupos por edad (años)</b>				
≤ 60	60.9 (28/46)	70.8 (17/24)	50 (11/22)	0.148
> 60	39.1 (18/46)	29.2 (7/24)	50 (11/22)	
<b>Historial de tabaquismo</b>				
Negativo	54.3 (25/46)	62.5 (15/24)	59.1 (13/22)	0.246
Positivo	45.7 (21/46)	37.5 (9/24)	40.9 (9/22)	
<b>Índice tabaquico</b>				
Media ± SD	15.659 ± 35.840	19.967 ± 46.166	10.736 ± 18.090	0.395
Mediana (rango)	0.00 (0 - 216)	0 (0 - 216)	0.6 (0 - 66)	0.662
<b>Exposición a humo de leña</b>				
Negativo	69.6 (32/46)	79.2 (19/24)	59.1 (13/22)	0.139
Positivo	30.4 (14/46)	20.8 (5/24)	40.9 (9/22)	
<b>Índice de humo de leña</b>				
Media ± SD	14.32 ± 38.961	16.44 ± 48.287	12.40 ± 29.353	0.754
Mediana (rango)	0 (0 - 184)	0 (0 - 184)	0 (0 - 112)	0.613
<b>ECOG al Dx</b>				
≤1	95.7 (44/46)	91.7 (22/24)	100 (22/22)	0.166
≥2	4.3 (2/46)	8.3 (2/24)	0 (0/22)	
<b>Histología</b>				
Otros	10.9 (5/46)	12.5 (3/24)	9.1 (2/22)	0.711
Adenocarcinoma	89.1 (41/46)	87.5 (21/24)	90.9 (20/22)	
Lepídico	4.9 (2/41)	0 (0/21)	10 (2/20)	0.510
Acinar / Papilar	46.3 (19/41)	47.6 (10/21)	45 (9/20)	
Micropapilar / Sólido	34.1 (14/41)	38.1 (8/21)	30 (6/20)	
No especificado	14.6 (6/41)	14.3 (3/21)	15 (3/20)	
<b>Variación blanco</b>				
ALK positivo	4.3 (2/46)	8.3 (2/24)	0 (0/22)	0.305
EGFR positivo	32.6 (15/46)	33.3 (8/24)	31.8 (7/22)	0.913
Ex19del	73.3 (11/15)	62.5 (5/8)	85.7 (6/7)	0.506
Ex21L858R	20.0 (3/15)	25 (2/8)	14.3 (1/7)	
Ex20T790M	6.7 (1/15)	12.5 (1/8)	0 (0/7)	
<b>ACE al Dx (ng/ml)</b>				
Media ± SD	49.458 ± 94.780	55.098 ± 88.579	43.304 ± 102.861	0.678
Mediana (rango)	7.85 (0.53 - 456)	8.16 (0.61 - 295)	7.585 (0.53 - 456)	0.582
<b>Estatus de PD-L1</b>				
No valorado	45.7 (21/46)	45.8 (11/24)	45.5 (10/22)	0.83
Negativo	28.3 (13/46)	25 (6/24)	31.8 (7/22)	
Positivo	26.1 (12/46)	29.2 (7/24)	22.7 (5/22)	
<b>Expresión de PD-L1</b>				
Expresión baja (<50%)	91.7 (9/12)	100 (7/7)	80 (4/5)	0.217
Expresión alta (≥50%)	8.3 (1/12)	0 (0/7)	20 (1/5)	

DTX: docetaxel; Dx: diagnóstico; SD: desviación estándar; ECOG: escala de calidad de vida según el Eastern Cooperative Oncology Group; ALK: cinasa de linfoma anaplásico; EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; Ex19del: delección del exón 19; Ex21L858R: sustitución de una leucina por una arginina en la posición 858 del exón 21; Ex20T790M: sustitución de una treonina por una metionina en la posición 790 del exón 20; ACE: antígeno carcinoembrionario; PD-L1: ligando 1 de muerte celular programada.

**Tabla 2. Conteos basales de biometría hemática de los pacientes**

Variable	Total	Pembrolizumab + DTX	DTX	P
	N=46	n=24	n=22	
<b>Plaquetas (miles/mm<sup>3</sup>)</b>				
Dx	285.500	284.000	285.500	0.226
<b>Neutrófilos (miles/mm<sup>3</sup>)</b>				
Dx	5.400	5.400	5.600	0.947
<b>Linfocitos (miles/mm<sup>3</sup>)</b>				
Dx	1.650	1.700	1.550	0.895
<b>Monocitos (miles/mm<sup>3</sup>)</b>				
Dx	0.600	0.600	0.600	0.586
<b>Eosinófilos (miles/mm<sup>3</sup>)</b>				
Dx	0.200	0.200	0.150	0.160
<b>Basófilos (miles/mm<sup>3</sup>)</b>				
Dx	0.000	0.000	0.000	0.140

DTX: docetaxel; Dx: diagnóstico.

**Tabla 3. RPL y RNL basales de los pacientes**

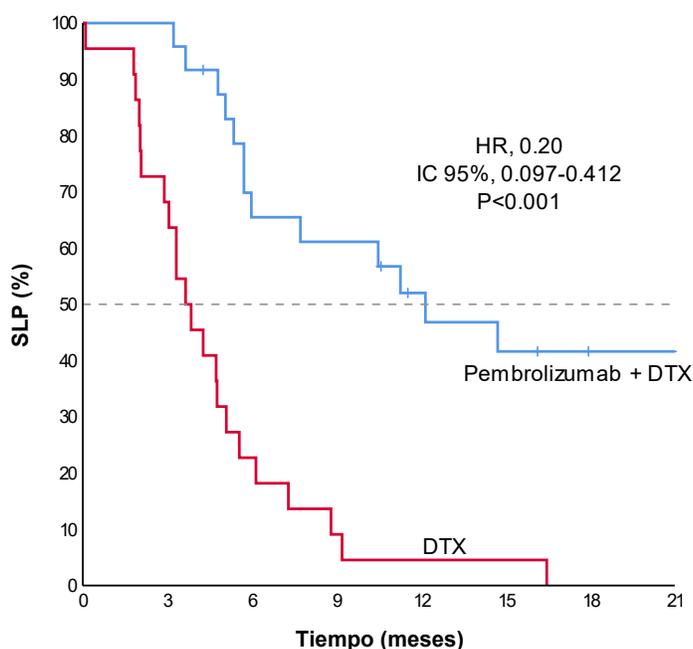
Variable	Total	Pembrolizumab + DTX	DTX	P
	N=46	n=24	n=22	
<b>RPL</b>				
Dx	177.853	169.250	206.268	0.344
<b>RNL</b>				
Dx	3.067	3.067	2.864	0.869

DTX: docetaxel; RPL: razón plaquetas/neutrófilos; RNL: razón neutrófilos/linfocitos; Dx: diagnóstico.

**Tabla 4. Concentraciones basales de albúmina y ACE de los pacientes**

Variable	Total	Pembrolizumab + DTX	DTX	P
	N=46	n=24	n=22	
<b>Albúmina (g/dL)</b>				
Dx	3.950	4.200	3.750	<b>0.0001</b>
Variable	Total	Pembrolizumab + DTX	DTX	P
	N=34	n=21	n=13	
<b>ACE (ng/ml)</b>				
DX	7.850	8.560	7.230	0.169

ACE: antígeno carcinoembrionario; DTX: docetaxel; Dx: diagnóstico.



Número en riesgo	0	3	6	9	12	15	18	21
Pembrolizumab + DTX	24	24	15	14	10	8	6	6
DTX	22	15	5	2	1	1	0	0

**Ilustración 5. Gráfica Kaplan-Meier de supervivencia en función del tratamiento.** Azul: curva de supervivencia libre de progresión en función del tratamiento con pembrolizumab en combinación con docetaxel. Rojo: curva de supervivencia libre de progresión en función del tratamiento con docetaxel. SLP: supervivencia libre de progresión; DTX: docetaxel; HR: razón de probabilidad instantánea; IC: intervalo de confianza.

## LOS GRUPOS DE TRATAMIENTO ESTUVIERON BALANCEADOS

Con el objetivo de verificar si los grupos de tratamiento estaban balanceados antes del inicio del tratamiento de segunda línea (1T), en cuanto a los valores de biometría hemática y concentración de albúmina y ACE, y de evaluar si estos valores cambiaron al cuarto ciclo de tratamiento (2T) en alguno de estos grupos; se realizaron comparaciones de las diferentes muestras de estos valores, tanto entre grupos de tratamiento, como entre las diferentes muestras dentro de cada grupo. Adicionalmente, con el objetivo de evaluar si entre los diferentes grupos existían diferencias significativas en la dinámica de los parámetros evaluados, se calculó el  $\Delta$  de cambio ( $\Delta T$ ) entre la 1T y la 2T restandole el valor de la 1T al valor de la 2T para cada parámetro.

Los valores de conteos de biometría hemática evaluados a los diferentes tiempos de muestreo en los grupos experimental y control, así como el  $\Delta T$  se encuentran resumidos en la **Tabla 5**. Los resultados del conteo absoluto evaluados antes del inicio de la terapia de segunda línea (1T), indican que no hay diferencias significativas entre el grupo control y el experimental, con respecto a plaquetas, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos ( $p > 0.05$ ) (**Tabla 5**).

Se calculó la razón plaquetas/linfocitos (RPL) dividiendo el valor de conteo absoluto de plaquetas entre el valor de conteo absoluto de linfocitos. Así como la razón neutrófilos/linfocitos (RNL) dividiendo el valor

del conteo absoluto de neutrófilos entre el valor del conteo absoluto de linfocitos para los tiempos de muestreo de antes del inicio de la terapia de segunda línea y después del cuarto ciclo de esta. La RPL y RNL calculadas para cada tiempo de muestreo en los grupos control y experimental se encuentran resumidos en la **Tabla 6**. Al comparar la RNL y la RPL calculadas con base en los valores de antes de iniciar el tratamiento de segunda línea (1T) entre los grupos experimental y control, no hubo diferencias significativas para ninguna de las razones ( $p>0.05$ ) (**Tabla 6**).

Las concentraciones de albúmina y ACE evaluados en análisis de rutina a diferentes tiempos de muestreo en los grupos experimental y control se encuentran resumidas en la **Tabla 7**. Antes de iniciar el tratamiento de segunda línea, no hubo diferencias significativas entre los grupos experimental y control en cuanto a los valores de albúmina y ACE ( $p>0.05$ ) (**Tabla 7**).

## **EL CONTEO ABSOLUTO DE MONOCITOS Y EOSINÓFILOS CAMBIA DURANTE EL TRATAMIENTO DE SEGUNDA LÍNEA**

Al evaluar si los valores de los diferentes parámetros analizados cambiaron entre los diferentes tiempos de muestreo (1T vs 2T), se obtuvo que en el grupo control el conteo absoluto de monocitos fue significativamente mayor al cuarto ciclo que antes de iniciar el tratamiento de segunda línea (0.650 vs 0.300,  $p=0.013$ ). Por otra parte, en el grupo experimental el conteo absoluto de eosinófilos fue significativamente menor al cuarto ciclo que antes de empezar el tratamiento de segunda línea (0.000 vs 0.100,  $p=0.003$ ) (**Tabla 5**).

Para los valores de RNL y RPL no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tiempos de muestreo (1T vs 2T) ( $p>0.05$ ) (**Tabla 6**).

Tanto en el grupo experimental como en el grupo control, la concentración de albúmina fue significativamente menor al cuarto ciclo que antes de iniciar el tratamiento de segunda línea (3.650 vs 3.900,  $p=0.001$ ; 3.400 vs 3.850,  $p=0.001$ ). No hubo diferencias significativas entre los valores de ACE a los diferentes tiempos de muestreo ( $p>0.05$ ) (**Tabla 7**).

**Tabla 5. Comparación de los valores de biometría hemática entre grupos de tratamiento**

Variable	Total N=46	Pembrolizumab + DTX n=24		DTX n=22		P
	Mediana	Mediana	P	Mediana	P	
<b>Plaquetas (miles/mm3)</b>						
1T	257.500	249.500	0.116	259.000	0.277	0.912
2T	279.000	281.000		268.000		0.621
ΔT	24.000	20.000		33.500		0.860
<b>Neutrófilos (miles/mm3)</b>						
1T	3.850	3.100	0.119	4.100	0.183	0.495
2T	4.200	4.150		4.400		0.758
ΔT	0.950	1.450		0.750		0.956
<b>Linfocitos (miles/mm3)</b>						
1T	1.000	1.050	0.847	0.850	0.881	0.402
2T	1.000	1.000		0.950		0.401
ΔT	0.000	0.000		0.050		0.974
<b>Monocitos (miles/mm3)</b>						
1T	0.400	0.400	0.527	0.300	<b>0.013</b>	0.609
2T	0.600	0.500		0.650		0.119
ΔT	0.100	0.050		0.300		0.168
<b>Eosinófilos (miles/mm3)</b>						
1T	0.100	0.100	<b>0.003</b>	0.100	0.387	0.666
2T	0.000	0.000		0.050		<b>0.031</b>
ΔT	0.000	-0.100		0.000		0.265
<b>Basófilos (miles/mm3)</b>						
1T	0.000	0.000	0.102	0.000	0.655	0.488
2T	0.000	0.000		0.000		0.823
ΔT	0.000	0.000		0.000		0.400

DTX: docetaxel; 1T: primera toma de muestra; 2T: segunda toma de muestra; ΔT: diferencia entre la primera y la segunda toma de muestra. Las comparaciones entre grupos de tratamiento se realizaron mediante la prueba de Mann-Withney y las comparaciones entre tomas del mismo grupo se realizaron mediante la prueba de Wilcoxon.

**Tabla 6. Comparación de los RPL y RNL entre grupos de tratamiento**

Variable	Total N=46	Pembrolizumab + DTX n=24		DTX n=22		P
	Mediana	Mediana	P	Mediana	P	
<b>RPL</b>						
1T	249.500	240.000	0.864	290.808	0.372	0.742
2T	286.414	284.206		314.636		0.333
<b>RNL</b>						
1T	4.000	3.095	0.954	5.533	0.808	0.409
2T	4.403	4.024		4.950		0.126

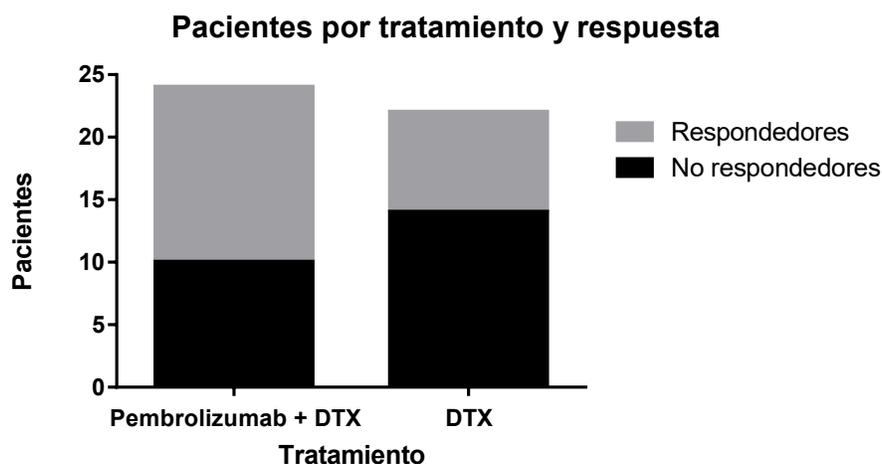
DTX: docetaxel; RPL: razón plaquetas/neutrófilos; RNL: razón neutrófilos/linfocitos; 1T: primera toma de muestra; 2T: segunda toma de muestra. Las comparaciones entre grupos de tratamiento se realizaron mediante la prueba de Mann-Withney y las comparaciones entre tomas del mismo grupo se realizaron mediante la prueba de Wilcoxon.

Tabla 7. Comparación de los valores de albúmina y ACE entre grupos de tratamiento

Variable	Total N=46	Pembrolizumab + DTX n=24		DTX n=22		P
	Mediana	Mediana	P	Mediana	P	
<b>Albúmina (g/dL)</b>						
1T	3.900	3.900	0.001	3.850	0.001	0.432
2T	3.550	3.650		3.400		0.309
ΔT	-0.300	-0.350		-0.300		0.825
Variable	Total N=34	Pembrolizumab + DTX n=22		DTX n=13		P
Variable	Mediana	Mediana	P	Mediana	P	
<b>ACE (ng/ml)</b>						
1T	8.830	10.320	0.741	6.160	0.507	0.218
2T	7.075	7.330		6.670		0.675
ΔT	0.165	-0.190		0.490		0.701

ACE: antígeno carcinoembrionario; DTX: docetaxel; 1T: primera toma de muestra; 2T: segunda toma de muestra; ΔT: diferencia entre la primera y la segunda toma de muestra. Las comparaciones entre grupos de tratamiento se realizaron mediante la prueba de Mann-Whitney y las comparaciones entre tomas del mismo grupo se realizaron mediante la prueba de Wilcoxon.

## EL CONTEO ABSOLUTO DE EOSINÓFILOS Y LA CONCENTRACIÓN DE ACE SON DIFERENTES ENTRE PACIENTES CON SLP CORTA Y SLP LARGA



**Ilustración 6. Estratificación de pacientes por grupo de tratamiento y respuesta.** Los pacientes fueron estratificados de acuerdo con el tratamiento de segunda línea asignado y la máxima respuesta a este. Cada barra en la gráfica representa un grupo de tratamiento. En negro se representa el número de pacientes no respondedores y en gris se representa el número de pacientes respondedores. DTX: docetaxel.

Con el objetivo de determinar si existían diferencias entre los valores de los diferentes parámetros evaluados por biometría hemática y la respuesta al tratamiento de segunda línea, los pacientes fueron estratificados en dos grupos (no respondedores y respondedores). En el grupo experimental 10 pacientes fueron no respondedores y 14 fueron respondedores, mientras que en el grupo control 14 pacientes fueron no respondedores y 8 fueron respondedores (**Ilustración 6**). Los resultados indican que antes del inicio de la terapia de segunda línea (1T) no hay diferencias significativas entre los no respondedores y los respondedores

en cuanto al conteo absoluto de plaquetas, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos ( $p>0.05$ ) (**Tabla 8**).

No se encontraron diferencias significativas, antes de iniciar el tratamiento de segunda línea, entre los no respondedores y los respondedores en cuanto a la RNL y RPL ( $p>0.05$ ) (**Tabla 9**).

Antes del inicio del tratamiento de segunda línea no hubo diferencias significativas entre los respondedores y los no respondedores en cuanto a la concentración de albúmina y ACE ( $p>0.05$ ) (**Tabla 10**).

**Tabla 8. Comparación de los valores de biometría hemática entre grupos de pacientes estratificados de acuerdo con la respuesta**

Variable	Total		P	Pembrolizumab + DTX		P	DTX		P
	NR n=24	R n=22		NR n=10	R n=14		NR n=14	R n=8	
	Mediana	Mediana		Mediana	Mediana		Mediana	Mediana	
<b>Plaquetas (miles/mm<sup>3</sup>)</b>									
1T	266.500	250.000	0.904	266.500	235.500	0.977	261.000	259.000	0.973
2T	290.000	267.500	0.775	284.500	273.500	0.977	305.000	253.000	0.616
$\Delta T$	24.000	24.000	0.912	11.500	23.000	0.709	33.500	48.000	0.714
<b>Neutrófilos (miles/mm<sup>3</sup>)</b>									
1T	3.950	2.850	0.350	4.000	2.600	0.235	3.950	4.300	0.815
2T	4.700	3.750	<b>0.025</b>	4.900	3.900	0.122	4.700	3.650	0.145
$\Delta T$	0.950	0.750	0.322	0.850	1.750	1.000	0.950	-1.050	0.127
<b>Linfocitos (miles/mm<sup>3</sup>)</b>									
1T	1.000	1.000	0.817	1.250	1.050	0.585	0.850	0.850	0.525
2T	1.000	1.000	0.782	1.150	1.000	0.752	0.950	0.900	0.973
$\Delta T$	0.150	-0.150	0.294	0.000	-0.100	0.886	0.200	-0.150	0.127
<b>Monocitos (miles/mm<sup>3</sup>)</b>									
1T	0.300	0.400	0.601	0.500	0.350	0.752	0.200	0.400	0.482
2T	0.650	0.500	0.121	0.600	0.500	0.546	0.700	0.600	0.297
$\Delta T$	0.300	0.050	0.136	0.000	0.100	0.796	0.450	-0.100	0.070
<b>Eosinófilos (miles/mm<sup>3</sup>)</b>									
1T	0.100	0.100	0.649	0.100	0.100	1.000	0.100	0.050	0.616
2T	0.000	0.000	0.562	0.000	0.000	0.472	0.100	0.000	0.365
$\Delta T$	0.000	-0.100	0.577	-0.100	-0.100	0.709	0.000	-0.050	0.441
<b>Basófilos (miles/mm<sup>3</sup>)</b>									
1T	0.000	0.000	0.090	0.000	0.000	0.709	0.000	0.000	0.616
2T	0.000	0.000	0.823	0.000	0.000	0.546	0.000	0.000	0.714
$\Delta T$	0.000	0.000	0.360	0.000	0.000	0.796	0.000	0.000	0.297

DTX: docetaxel; Dx: diagnóstico; NR: no respondedores; R: respondedores; 1T: primera toma de muestra; 2T: segunda toma de muestra;  $\Delta T$ : diferencia entre la primera y la segunda toma de muestra. Las comparaciones entre grupos de respuesta se realizaron mediante la prueba de Mann-Withney.

**Tabla 9. Comparación de los RPL y RNL entre grupos de pacientes estratificados de acuerdo con la respuesta**

Variable	Total		P	Pembrolizumab + DTX		P	DTX		P
	NR n=24	R n=22		NR n=10	R n=14		NR n=14	R n=8	
	Mediana	Mediana		Mediana	Mediana		Mediana	Mediana	
<b>RPL</b>									
1T	249.500	265.333	0.792	240.000	265.333	0.709	290.808	276.500	0.570
2T	288.252	281.111	0.792	286.044	272.484	1.000	318.636	309.333	0.920
<b>RNL</b>									
1T	4.575	2.679	0.495	4.425	2.477	0.841	5.533	5.111	0.482
2T	5.057	3.850	0.090	4.552	3.314	0.064	5.700	4.458	0.815

DTX: docetaxel; NR: no respondedores; R: respondedores; RPL: razón plaquetas/neutrófilos; RNL: razón neutrófilos/linfocitos; 1T: primera toma de muestra; 2T: segunda toma de muestra. Las comparaciones entre grupos de respuesta se realizaron mediante la prueba de Mann-Withney.

**Tabla 10. Comparación de los valores de albúmina y ACE entre grupos de pacientes estratificados de acuerdo con la respuesta**

Variable	Total		P	Pembrolizumab + DTX		P	DTX		P
	NR n=24	R n=22		NR n=10	R n=14		NR n=14	R n=8	
	Mediana	Mediana		Mediana	Mediana		Mediana	Mediana	
<b>Albúmina (g/dL)</b>									
1T	3.900	3.900	0.580	3.900	3.900	0.931	3.800	3.850	0.714
2T	3.500	3.650	0.691	3.550	3.700	0.709	3.400	3.400	0.920
ΔT	-0.300	-0.250	0.825	-0.400	-0.250	0.752	-0.300	-0.250	1.000
Variable	Total		P	Pembrolizumab + DTX		P	DTX		P
	NR n=15	R n=19		NR n=8	R n=13		NR n=7	R n=6	
	Mediana	Mediana		Mediana	Mediana		Mediana	Mediana	
<b>ACE (ng/ml)</b>									
1T	12.600	7.790	0.584	12.975	8.680	0.804	6.880	3.405	0.295
2T	11.000	3.760	0.336	13.060	4.570	0.750	6.990	2.995	0.233
ΔT	1.520	-2.080	<b>0.036</b>	3.530	-4.170	<b>0.030</b>	0.830	0.445	0.836

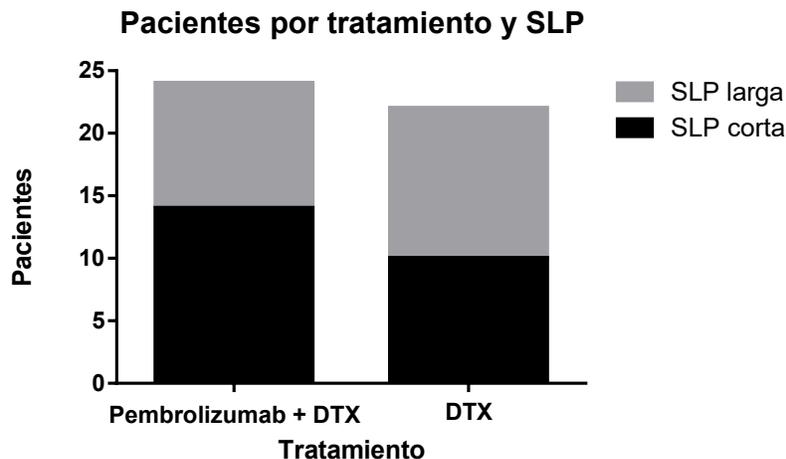
DTX: docetaxel; NR: no respondedores; R: respondedores; ACE: antígeno carcinoembrionario; 1T: primera toma de muestra; 2T: segunda toma de muestra; ΔT: diferencia entre la primera y la segunda toma de muestra. Las comparaciones entre grupos de respuesta se realizaron mediante la prueba de Mann-Withney.

Con el objetivo de determinar si existían diferencias entre los valores de los diferentes parámetros evaluados por biometría hemática y la SLP bajo el tratamiento de segunda línea, los pacientes fueron estratificados en dos grupos (SLP corta y SLP larga). En el grupo experimental 10 pacientes tuvieron una SLP corta y 14 tuvieron SLP larga, mientras que en el grupo control 12 pacientes tuvieron una SLP corta y 10 tuvieron una SLP larga (**Ilustración 7**). Antes de iniciar el tratamiento de segunda línea (1T), el conteo absoluto de eosinófilos fue significativamente mayor en los pacientes con SLP larga con respecto a los pacientes con SLP corta del grupo experimental (0.100 vs 0.000,  $p=0.042$ ) (**Tabla 11**).

No hubo diferencias significativas, antes del inicio del tratamiento de segunda línea, entre los pacientes con SLP corta y los pacientes con SLP larga en cuanto a la RNL y la RPL ( $p>0.05$ ) (**Tabla 12**).

Antes del inicio del tratamiento de primera línea, al considerar a todos los pacientes y a los del grupo control, las concentraciones de ACE para los pacientes con SLP corta fueron significativamente mayores con respecto a los pacientes con SLP larga (13.775 vs 5.465,  $p=0.039$ ; 12.380 vs 1.790,  $p=0.022$ ). Mientras que para las concentraciones de albúmina no hubo diferencias significativas ( $p>0.05$ ) (**Tabla 13**).

Con el objetivo de determinar si la concentración de ACE antes del inicio del tratamiento de segunda línea es un buen predictor de la SLP, se realizó un análisis univariado de regresión logística binaria, estratificando la duración de la SLP en corta y larga según los puntos de corte establecidos para este estudio. Además, se realizó un análisis univariado de regresión de Cox. No se obtuvo una asociación significativa ( $p>0.05$ ) (no se muestran los datos).



**Ilustración 7. Estratificación de pacientes por grupo de tratamiento y duración de la SLP.** Los pacientes fueron estratificados de acuerdo con el tratamiento de segunda línea asignado y la máxima respuesta a este. Cada barra en la gráfica representa un grupo de tratamiento. En negro se representa el número de pacientes con SLP corta y en gris se representa el número de pacientes con SLP larga. DTX: docetaxel; SLP: supervivencia libre de progresión.

**Tabla 11. Comparación de los valores de biometría hemática entre grupos de pacientes estratificados de acuerdo con la duración de la SLP**

Variable	Total		P	Pembrolizumab + DTX		P	DTX		P
	SLP corta n=22	SLP larga n=24		SLP corta n=10	SLP larga n=14		SLP corta n=12	SLP larga n=10	
<b>Plaquetas (miles/mm3)</b>									
1T	268.000	235.500	0.768	258.500	235.500	0.585	285.500	242.000	0.872
2T	290.000	273.500	0.253	352.000	262.500	<b>0.048</b>	256.500	297.500	0.674
ΔT	26.000	24.000	0.582	16.500	23.000	0.666	33.500	48.000	1.000
<b>Neutrófilos (miles/mm3)</b>									
1T	3.900	3.500	0.768	2.800	3.500	0.841	4.700	3.500	0.180
2T	4.800	3.850	0.118	5.000	4.000	0.285	4.800	3.750	0.314
ΔT	1.200	0.600	0.531	1.650	0.300	0.285	0.350	1.250	0.974
<b>Linfocitos (miles/mm3)</b>									
1T	0.900	1.050	0.526	1.100	1.050	0.886	0.850	1.050	0.283
2T	1.000	1.000	0.699	1.150	1.000	0.796	0.950	0.900	0.381
ΔT	0.100	0.000	0.343	-0.100	0.000	0.796	0.150	-0.050	0.254
<b>Monocitos (miles/mm3)</b>									
1T	0.350	0.400	0.700	0.350	0.450	0.709	0.300	0.300	0.722
2T	0.600	0.600	0.486	0.550	0.500	0.472	0.650	0.650	0.821
ΔT	0.100	0.100	0.529	0.050	0.050	0.886	0.400	0.200	0.923
<b>Eosinófilos (miles/mm3)</b>									
1T	0.050	0.100	0.599	0.000	0.100	<b>0.042</b>	0.100	0.100	0.974
2T	0.000	0.000	0.843	0.000	0.000	1.000	0.050	0.050	1.000
ΔT	0.000	-0.100	0.136	0.000	-0.100	0.084	0.000	0.000	0.821
<b>Basófilos (miles/mm3)</b>									
1T	0.000	0.000	0.938	0.000	0.000	0.709	0.000	0.000	0.923
2T	0.000	0.000	0.337	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.418
ΔT	0.000	0.000	0.400	0.000	0.000	0.709	0.000	0.000	0.722

DTX: docetaxel; SLP: sobrevida libre de progresión; 1T: primera toma de muestra; 2T: segunda toma de muestra; ΔT: diferencia entre la primera y la segunda toma de muestra. Las comparaciones entre grupos de duración de SLP se realizaron mediante la prueba de Mann-Whitney.

**Tabla 12. Comparación de los RPL y RNL entre grupos de pacientes estratificados de acuerdo con la duración de la SLP**

Variable	Total		P	Pembrolizumab + DTX		P	DTX		P
	SLP corta n=22	SLP larga n=24		SLP corta n=10	SLP larga n=14		SLP corta n=12	SLP larga n=10	
<b>RPL</b>									
1T	324.444	223.500	0.121	313.000	225.333	0.285	324.444	211.174	0.254
2T	288.252	281.111	0.159	286.044	229.778	0.341	318.636	309.333	0.418
<b>RNL</b>									
1T	4.800	2.917	0.118	2.595	3.500	0.752	6.833	1.703	0.059
2T	5.318	4.139	0.202	4.975	3.707	0.403	5.700	4.458	0.381

DTX: docetaxel; SLP: sobrevida libre de progresión; RPL: razón plaquetas/neutrófilos; RNL: razón neutrófilos/linfocitos; Dx: diagnóstico; 1T: primera toma de muestra; 2T: segunda toma de muestra. Las comparaciones entre grupos de duración de SLP se realizaron mediante la prueba de Mann-Whitney.

**Tabla 13. Comparación de los valores de albúmina y ACE entre grupos de pacientes estratificados de acuerdo con la duración la SLP**

Variable	Total		P	Pembrolizumab + DTX		P	DTX		P
	SLP corta n=22	SLP larga n=24		SLP corta n=10	SLP larga n=14		SLP corta n=12	SLP larga n=10	
	Mediana	Mediana		Mediana	Mediana		Mediana	Mediana	
<b>Albúmina (g/dL)</b>									
1T	3.750	3.900	0.925	3.800	3.900	0.259	3.650	3.900	0.582
2T	3.400	3.700	0.056	3.550	3.700	0.312	3.300	3.700	0.159
ΔT	-0.300	-0.250	0.544	-0.300	-0.350	0.796	-0.300	-0.150	0.228
Variable	Total		P	Pembrolizumab + DTX		P	DTX		P
	SLP corta n=15	SLP larga n=19		SLP corta n=8	SLP larga n=13		SLP corta n=7	SLP larga n=6	
	Mediana	Mediana		Mediana	Mediana		Mediana	Mediana	
<b>ACE (ng/ml)</b>									
1T	13.775	5.465	<b>0.039</b>	14.880	8.680	0.268	12.380	1.790	<b>0.022</b>
2T	18.550	3.445	<b>0.023</b>	18.550	7.160	0.268	20.070	2.920	<b>0.008</b>
ΔT	0.660	-0.090	0.217	3.670	-2.080	0.268	0.240	0.600	0.836

ACE: antígeno carcinoembrionario; DTX: docetaxel; SLP: sobrevida libre de progresión; 1T: primera toma de muestra; 2T: segunda toma de muestra; ΔT: diferencia entre la primera y la segunda toma de muestra. Las comparaciones entre grupos de duración de SLP se realizaron mediante la prueba de Mann-Withney.

## EL CONTEO ABSOLUTO DE NEUTRÓFILOS ES UN PREDICTOR DE LA RESPUESTA

Los resultados de biometría hemática después del cuarto ciclo de la terapia de segunda línea (2T), indican que el conteo absoluto de eosinófilos es significativamente mayor en el grupo control que en el grupo experimental (0.050 vs 0.00,  $p=0.031$ ). Mientras que para los conteos absolutos de plaquetas, neutrófilos, linfocitos, monocitos y basófilos no hubo diferencias significativas ( $p>0.05$ ) (**Tabla 5**).

Al comparar la RNL y la RPL calculadas con base en los valores posteriores al cuarto ciclo del tratamiento de segunda línea (2T) entre los grupos experimental y control, no hubo diferencias significativas para ninguna de las razones ( $p>0.05$ ) (**Tabla 6**).

No hubo diferencias significativas después del cuarto ciclo del tratamiento de segunda línea entre los grupos experimental y control en cuanto a los valores de albúmina y ACE ( $p>0.05$ ) (**Tabla 7**).

El conteo absoluto de neutrófilos evaluado después del cuarto ciclo del tratamiento de segunda línea (2T) fue significativamente mayor en el grupo de no respondedores con respecto al grupo de respondedores totales (4.700 vs 3.750,  $p=0.025$ ), sin embargo, al estratificar a los pacientes por grupo de tratamiento se pierde este efecto ( $p>0.05$ ). No hubo diferencias significativas en cuanto al conteo absoluto de plaquetas, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos ( $p>0.05$ ) (**Tabla 8**).

No se encontraron diferencias significativas, después del cuarto ciclo del tratamiento de segunda línea, entre los no respondedores y los respondedores en cuanto a la RNL y la RPL ( $p>0.05$ ) (**Tabla 9**).

Después del cuarto ciclo del tratamiento de segunda línea no hubo diferencias significativas entre los respondedores y los no respondedores en cuanto a la concentración de albúmina y ACE ( $p>0.05$ ) (**Tabla 10**).

Con el objetivo de determinar si el conteo de neutrófilos, evaluado después de cuarto ciclo del tratamiento de segunda línea, es un buen predictor de la respuesta a dicho tratamiento, se realizó un análisis univariado de regresión logística binaria. Hubo una asociación significativa entre los niveles de neutrófilos y la respuesta al tratamiento, en la que los pacientes con un conteo de neutrófilos elevado tienen una menor probabilidad de responder al tratamiento que aquellos con un conteo de neutrófilos más bajo (OR=0.685, IC 95%=0.491-0.954,  $p=0.025$ ). También, con el objetivo de determinar si el conteo de neutrófilos después de cuarto ciclo del tratamiento de segunda línea sería un buen predictor de la respuesta a dicho tratamiento independientemente de otros factores, se realizó un análisis multivariado de regresión logística binaria, en el que se incluyeron como covariables al ECOG, edad, estadio clínico de la enfermedad y grupo de tratamiento asignado. Se obtuvo que la asociación significativa entre el conteo absoluto de neutrófilos y la respuesta al tratamiento es independiente de todos los factores incluidos en el análisis (OR=0.642, IC 95%=0.434-0.950,  $p=0.027$ ) (**Tabla 14**).

**Tabla 14. Análisis multivariado de regresión logística binaria para predecir la respuesta en función del conteo absoluto de neutrófilos**

Variable	OR (95% IC)	P
<b>Neutrófilos (2T)</b>	0.642 (0.434-0.950)	<b>0.027</b>
<b>ECOG</b>	0.579 (0.025-13.155)	0.733
<b>Edad</b>	0.957 (0.901-1.016)	0.149
<b>Estadio clínico</b>	1.562 (0.185-13.155)	0.682
<b>Grupo de tratamiento</b>	0.402 (0.100-1.621)	0.200

OR: razón de momios; IC: intervalo de confianza; ECOG: escala de calidad de vida según el Eastern Cooperative Oncology Group; 2T: segunda toma de muestra.

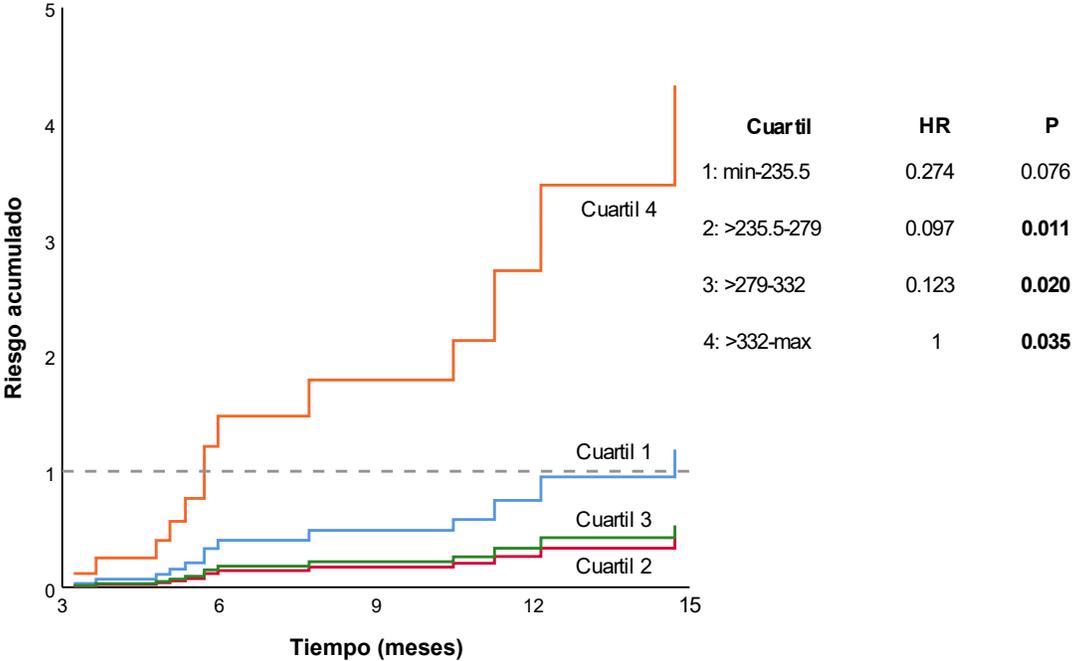
## EL CONTEO ABSOLUTO DE PLAQUETAS ES UN PREDICTOR DE LA SLP

El conteo absoluto de plaquetas, evaluado al cuarto ciclo del tratamiento de segunda línea (2T), fue significativamente menor en los pacientes con SLP larga con respecto a los pacientes con SLP corta del grupo experimental (262.500 vs 352.000,  $p=0.048$ ) (**Tabla 11**).

Con el objetivo de determinar si el conteo de plaquetas después de cuarto ciclo del tratamiento de segunda línea es un buen predictor de la duración de la SLP bajo dicho tratamiento para el grupo experimental, se realizó un análisis univariado de regresión logística binaria. Se obtuvo una asociación significativa entre el conteo absoluto de plaquetas y la SLP, en la que los pacientes con un conteo de plaquetas elevado tienen una menor probabilidad de pertenecer al grupo de SLP larga que aquellos con un conteo de plaquetas más bajo (OR=0.987, IC 95%=0.976-0.999,  $p=0.037$ ).

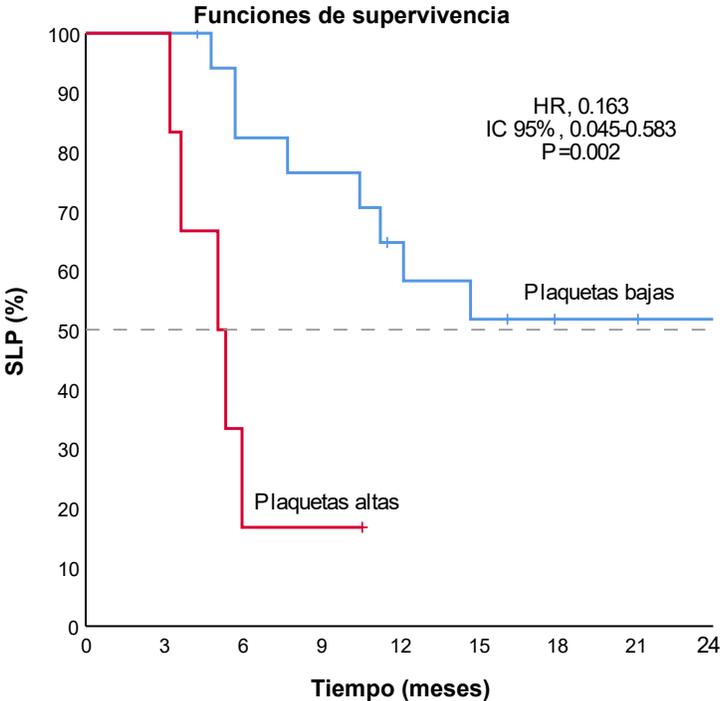
Adicionalmente, con el objetivo de determinar si el conteo de plaquetas, después de cuarto ciclo del tratamiento de segunda línea, es un buen predictor de la duración de la SLP, como una variable de tiempo continua; bajo dicho tratamiento para el grupo experimental, se realizó un análisis univariado de regresión de Cox. Se obtuvo una asociación significativa entre el conteo absoluto de plaquetas y la SLP, en la que los pacientes con un conteo de plaquetas elevado tienen una mayor probabilidad de progresar en un momento de tiempo determinado que aquellos con un conteo de plaquetas más bajo (HR=1.006, IC 95%=1.000-1.011, p=0.040).

Posteriormente, para evaluar si la asociación entre el conteo absoluto de plaquetas y la SLP es lineal, se dividió a los pacientes en cuatro grupos según los cuartiles de conteo absoluto de plaquetas. Se obtuvo una asociación significativa entre el conteo absoluto de plaquetas y la SLP para los cuartiles 2, 3 y 4 (HR=0.097, IC 95%=0.016-0.585, p=0.011; HR=0.123, IC 95%=0.021-0.722, p=0.020; p=0.035) pero no para el cuartil 1 (p>0.05). No se observó una asociación lineal entre el conteo absoluto de plaquetas y la duración de la SLP (**Ilustración 8**).



**Ilustración 8. Función de riesgo para el conteo absoluto de plaquetas por cuartiles.** Cada línea representa la función de riesgo acumulado de progresar en un momento determinado de tiempo dado un intervalo de valores del conteo absoluto de plaquetas, evaluado al cuarto ciclo del tratamiento de segunda línea con pembrolizumab en combinación con docetaxel. HR: razón de riesgo instantáneo.

Debido a que la asociación no fue lineal, se dividió a los pacientes en dos grupos según el conteo absoluto de plaquetas (alto y bajo) utilizando como punto de corte el cuartil 3, y se realizó un análisis de supervivencia a través del método de Kaplan-Meier. El análisis confirmó que existe una diferencia significativa en la duración de la SLP entre los grupos de pacientes con un conteo de plaquetas alto y bajo ( $\leq 332$ ) (HR=0.163, IC 95%=0.045-0.583, p=0.002) (**Ilustración 9**).



Número en riesgo		0	3	6	9	12	15	18	21	24
Plaquetas bajas		18	18	14	13	10	8	6	6	5
Plaquetas altas		6	6	1	0	0	0	0	0	0

**Ilustración 9. Gráfica Kaplan-Meier de supervivencia en función del conteo de plaquetas alto o bajo.** Cada línea representa la función de riesgo acumulado de progresar en un momento determinado de tiempo dado un conteo absoluto de plaquetas bajo ( $\leq 332$ ) o alto, evaluado al cuarto ciclo del tratamiento de segunda línea con pembrolizumab en combinación con docetaxel. Azul: curva de supervivencia libre de progresión en función del conteo bajo de plaquetas. Rojo: curva de supervivencia libre de progresión en función del conteo alto de plaquetas. SLP: supervivencia libre de progresión; HR; razón de probabilidad instantánea; IC: intervalo de confianza.

También, con el objetivo de confirmar el valor predictivo del punto de corte establecido para el conteo de plaquetas, se realizó un análisis univariado de regresión de Cox. Se obtuvo que los pacientes, bajo el tratamiento de pembrolizumab en combinación con DTX, con un conteo absoluto de plaquetas bajo ( $\leq 332$ ) tienen una menor probabilidad de progresar en un momento de tiempo determinado que aquellos pacientes con un conteo absoluto de plaquetas alto (HR=0.163, IC 95%=0.045-0.583, p=0.005).

Adicionalmente, con el objetivo de determinar si el conteo de plaquetas después de cuarto ciclo del tratamiento de pembrolizumab en combinación con DTX en segunda línea es un buen predictor de la duración

de la SLP bajo dicho tratamiento, independientemente de otros factores, se realizó un análisis multivariado de regresión de Cox, en el que se incluyeron como covariables al ECOG, edad y estadio clínico de la enfermedad. Se obtuvo que la asociación significativa entre el conteo absoluto de plaquetas y la duración de la SLP es independiente de todos los demás factores incluidos en el análisis (HR=0.166, IC 95%=0.042-0.659, p=0.011) (**Tabla 15**).

**Tabla 15. Análisis multivariado de regresión de Cox para predecir la duración de la SLP en función del conteo absoluto de plaquetas alto o bajo**

Variable	HR (95% IC)	P
Plaquetas (2T)	0.166 (0.042-0.658)	<b>0.011</b>
ECOG	1.786 (0.213-14.958)	0.593
Edad (años)	0.994 (0.947-1.042)	0.789
Estadio clínico	0.000 (0.000)	0.989

HR: razón de riesgo instantáneo; IC: intervalo de confianza; 2T: segunda toma de muestra.

No hubo diferencias significativas entre los pacientes con SLP corta y los pacientes con SLP larga al cuarto ciclo del tratamiento de segunda línea (2T) en cuanto a la RPL y a la RNL ( $p>0.05$ ) (**Tabla 12**).

Después del cuarto ciclo del tratamiento de segunda línea, al considerar a todos los pacientes y a los del grupo control, las concentraciones de ACE son significativamente mayores en los pacientes con SLP corta con respecto a los pacientes con SLP larga (18.550 vs 3.445,  $p=0.023$ ; 20.070 vs 2.920,  $p=0.008$ ). Mientras que para las concentraciones de albúmina no hubo diferencias significativas ( $p>0.05$ ) (**Tabla 13**).

Con el objetivo de determinar si la concentración de ACE después del cuarto ciclo del tratamiento de segunda línea es un buen predictor de la SLP, se realizó un análisis univariado de regresión logística binaria, estratificando la duración de la SLP en corta y larga según los puntos de corte establecidos para este estudio. Además, se realizó un análisis univariado de regresión de Cox. No se obtuvo una asociación significativa ( $p>0.05$ ) (no se muestran los datos).

## **LA DINÁMICA DE LA CONCENTRACIÓN DE ACE ES DIFERENTE ENTRE LOS RESPONDEDORES Y LOS NO RESPONDEDORES**

No hubo diferencias significativas entre el grupo experimental y el grupo control para la  $\Delta T$  en cuanto al conteo absoluto de plaquetas, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos ( $p>0.05$ ) (**Tabla 5**). Tampoco hubo diferencias significativas entre el grupo experimental y el grupo control en cuanto a la  $\Delta T$  de la concentración de albúmina y de la de ACE ( $p>0.05$ ) (**Tabla 7**).

No hubo diferencias significativas entre los no respondedores y los respondedores para la  $\Delta T$  en cuanto al conteo absoluto de plaquetas, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos ( $p>0.05$ ) (**Tabla 8**).

Al considerar a todos los pacientes y al grupo experimental, la  $\Delta T$  de la concentración de ACE es significativamente menor en los pacientes respondedores con respecto a los no respondedores (-2.080 vs 1.520,  $p=0.036$ ; -4.170 vs 3.530,  $p=0.030$ ) (**Tabla 10**). Mientras que para la  $\Delta T$  de la concentración de albúmina no hubo diferencias significativas.

No hubo diferencias significativas entre los pacientes con SLP corta y los pacientes con SLP larga para la  $\Delta T$  en cuanto al conteo absoluto de plaquetas, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos ( $p>0.05$ ) (**Tabla 11**). Tampoco hubo diferencias significativas entre los pacientes con SLP corta y los pacientes con SLP larga en cuanto a la  $\Delta T$  de la concentración de albúmina y de la de ACE ( $p>0.05$ ) (**Tabla 13**).

## **EXISTEN DIFERENCIAS EN EL INMUNOFENOTIPO ENTRE LOS GRUPOS DE TRATAMIENTO**

Con el objetivo de caracterizar de manera más exhaustiva a las poblaciones de células del sistema inmunológico circulantes en sangre periférica se realizó la inmunofenotipificación mediante tinción de inmunofluorescencia extracelular por citometría de flujo. Tanto los porcentajes, como las intensidades medias de fluorescencia (MFI) de los marcadores, de las diferentes poblaciones evaluadas por citometría de flujo en cada grupo se encuentran resumidos en la **Tabla A 2**. Al cuarto ciclo del tratamiento de segunda línea el valor fue significativamente menor en el grupo experimental con respecto al grupo control para las siguientes variables: porcentaje de linfocitos T citotóxicos con expresión de PD-1 (CD3+ CD8+ PD-1+) (2.065 vs 17.1,  $p=0.037$ ), porcentaje de linfocitos T con expresión de PD-1 (CD3+CD8+) (0.615 vs 2.885,  $p=0.016$ ), MFI de PD-1 en los linfocitos T con expresión de PD-1 (CD+PD1+) (634.000 vs 690.500,  $p=0.037$ ), porcentaje de linfocitos cooperadores T regulatorios (CD3+CD4+CCR4+CD25+PD-1+) (96.2 vs 99.9,  $p=0.024$ ), porcentaje de células dendríticas plasmocitoides con expresión de PD-1 (CD3-CD19-CD14-CD20-HLA-DR+CD11c-CD123+PD-1+) (5.025 vs 11.350,  $p=0.037$ ) y porcentaje de neutrófilos con expresión de PD-1 (CD3- CD19-CD14-CD20-CD16+CD66b+PD-1+) (6.225 vs 10.875,  $p=0.037$ ) (**Tabla 16**).

## **EXISTEN DIFERENCIAS EN EL INMUNOFENOTIPO ENTRE LOS RESPONDEDORES Y LOS NO RESPONDEDORES**

Al considerar a todos los pacientes, los valores obtenidos mediante citometría de flujo fueron significativamente mayores en los no respondedores con respecto a los respondedores, antes del inicio del tratamiento de segunda línea, para las siguientes variables: porcentaje de linfocitos T citotóxicos de memoria central (CD3+CD8+CCR7+CD45RA-) (0.32 vs 0.00,  $p=0.024$ ), porcentaje de linfocitos B vírgenes con expresión de PD-1 (CD3-CD19+CD20-CD27-CD38-PD-1+) (3.84 vs 0.11,  $p=0.042$ ), porcentaje de linfocitos cooperadores Th2 (CD3+CD4+CCR6-CXCR3-CCR4+ IL4R+) (29.00 vs 18.70,  $p=0.042$ ), porcentaje de linfocitos cooperadores Th2 activos (CD3+CD4+CCR6-CXCR3-CCR4+ IL4R+HLA-DR+) (15.70 vs 5.62,

p=0.042) y porcentaje de neutrófilos con expresión de PD-1 (CD3-CD19-CD14-CD20-CD16+CD66b+PD-1+) (7.64 vs 2.78, p=0.042) (**Tabla 17**).

El valor obtenido mediante citometría de flujo fue significativamente menor en los no respondedores con respecto a los respondedores, antes del inicio del tratamiento de segunda línea, para la variable MFI de PD-1 en los linfocitos T con expresión de PD-1 (646 vs 761, p=0.019) (**Tabla 17**).

Los valores obtenidos mediante citometría de flujo fueron significativamente mayores en los no respondedores con respecto a los respondedores, al cuarto ciclo del tratamiento de segunda línea, para las siguientes variables: porcentaje de linfocitos T cooperadores de memoria efectora inactiva con expresión de PD-1 (CD3+CD4+CCR7-CD45RA-CD38-HLA-DR-PD-1+) (1.15 vs 0.00, p=0.032), porcentaje de linfocitos T cooperadores de memoria efectora con expresión de PD-1 (CD3+CD4+CCR7-CD45RA-PD-1+) (1.06 vs 0.00, p=0.021), linfocitos T cooperadores con expresión de PD-1 (CD3+CD4+PD-1+) (1.00 vs 0.00, p=0.021), linfocitos cooperadores Th1 inactivos con expresión de PD-1 (CD3+CD4+CXCR3+CCR6-IFN-R+IL-12R+HLA-DR-PD-1+) (6.67 vs 0.00, p=0.046), linfocitos cooperadores Th1 con expresión de PD-1 (CD3+CD4+CXCR3+CCR6-IFN-R+IL-12R+PD-1+) (6.90 vs 0.00, p=0.021), porcentaje de linfocitos cooperadores Th1 con expresión de PD-1 (CD3+CD4+CXCR3+CCR6-PD-1+) (3.95 vs 0.65, p=0.027), porcentaje de linfocitos cooperadores Th1 con expresión de PD-L1 (CD3+CD4+CXCR3+CCR6-PD-L1+) (1.17 vs 0.35, p=0.041), porcentaje de linfocitos cooperadores Th2 con expresión de PD-L1 (CD3+CD4+CXCR3-CCR6-PD-L1+) (0.63 vs 0.00, p=0.024), porcentaje de linfocitos T cooperadores reguladores de memoria activos con expresión de PD-1 (CD3+CD4+CCR4+CD25+CD127<sup>hi</sup>CD45RO+HLA-DR+PD-1+) (33.3 vs 0.00, p=0.046), porcentaje de linfocitos T cooperadores reguladores vírgenes inactivos con expresión de PD-1 (CD3+CD4+CCR4+CD25+CD127<sup>low</sup>CD45RO+HLA-DR-PD-1+) (2.17 vs 0.0, p=0.015), porcentaje de linfocitos T cooperadores reguladores vírgenes con expresión de PD-1 (CD3+CD4+CCR4+CD25+CD127<sup>low</sup>CD45RO+PD-1+) (1.71 vs 0.00, p=0.021), porcentaje de linfocitos T cooperadores reguladores con expresión de PD-1 (CD3+CD4+CCR4+CD25+CD45+PD-1+) (4.51 vs 0.59, p=0.041), porcentaje de linfocitos T cooperadores reguladores con expresión de PD-L1 (CD3+CD4+CCR4+CD25+CD45+PD-L1+) (0.75 vs 0.00, p=0.047), porcentaje de células NK con expresión de PD-1 (CD3+CD19-CD20-CD14-CD16+CD161+CD56+PD-1+) (13.4 vs 3.12, p=0.012) y porcentaje de monocitos con expresión de PD-1 (CD3+CD19-CD20-CD14+PD-1+) (4.94 vs 0.00, p=0.015) (Tabla 17).

Los valores obtenidos mediante citometría de flujo fueron significativamente menores en los no respondedores con respecto a los respondedores, antes del inicio del tratamiento de segunda línea, para la variable porcentaje de células dendríticas mieloides con expresión de PD-1 (CD3-CD19-CD14-CD20-HLA-DR+CD11c+CD123-PD-1+) (0.00 vs 0.47, p=0.034) (**Tabla 17**).

Los valores obtenidos mediante citometría de flujo fueron significativamente mayores en los no respondedores con respecto a los respondedores, al cuarto ciclo del tratamiento de segunda línea, para las siguientes variables: MFI de PD-L1 de los linfocitos B de memoria que expresan PD-L1 (CD3-CD19+CD20+PD-L1+) (293 vs 253,  $p=0.046$ ), porcentaje de linfocitos T cooperadores Th1 activos con expresión de PD-L1 (CD3+CD4+CXCR3+CCR6-IFN-R+IL-12R+HLA-DR+PD-L1+) (5.88 vs 0.00,  $p=0.48$ ), porcentaje de linfocitos T cooperadores Th17 (CD3+CD4+CCR6+CXCR3IL-6R+) (100.00 vs 50.00,  $p=0.043$ ), porcentaje de linfocitos T cooperadores reguladores de memoria activos (CD3+CD4+CCR4+CD25+CD127hiCD45RO+HLA-DR+) (28.60 vs 10.20,  $p=0.046$ ), porcentaje de linfocitos T cooperadores reguladores de memoria con expresión de PD-L1 (CD3+CD4+CCR4+CD25+CD127hiCD45RO+PD-L1+) (7.14 vs 0.00,  $p=0.46$ ), porcentaje de linfocitos T cooperadores reguladores vírgenes inactivos con expresión de PD-1 (CD3+CD4+CCR4+CD25+CD127lowCD45RO+HLA-DR-PD-1+) (1.56 vs 0.00,  $p=0.046$ ), porcentaje de linfocitos T cooperadores reguladores con expresión de PD-L1 (CD3+CD4+CCR4+CD25+CD45+PD-L1+) (0.75 vs 0.00,  $p=0.046$ ) y porcentaje de monocitos con expresión de PD-1 (CD3+CD19-CD20-CD14+PD-1+) (3.03 vs 0.00,  $p=0.046$ ) (**Tabla 17**).

El valor obtenido mediante citometría de flujo fue significativamente menor en los no respondedores con respecto a los respondedores, al cuarto ciclo del tratamiento de segunda línea, para la variable porcentaje de células plasmáticas con expresión de PD-1 (CD3-CD19+CD20-CD27+CD38+PD-1+) (0.00 vs 0.33,  $p=0.034$ ) (**Tabla 17**).

No se realizó la comparación entre los no respondedores y los respondedores dentro del grupo de tratamiento control porque la  $n$  resultó ser muy pequeña para los no respondedores.

Con el objetivo de determinar si las variables que mostraron una diferencia significativa entre los no respondedores y los respondedores son un buen predictor de la respuesta al tratamiento de segunda línea, se realizó un análisis univariado de regresión logística binaria con cada una de ellas. No se obtuvo una asociación significativa para ninguna de las variables ( $p>0.05$ ) (no se muestran los datos).

## **EXISTEN DIFERENCIAS EN EL INMUNOFENOTIPO ENTRE LOS PACIENTES CON SLP CORTA Y SLP LARGA**

Al considerar a todos los pacientes los valores obtenidos mediante citometría de flujo fueron significativamente mayores en los pacientes con SLP corta con respecto a los pacientes con SLP larga, antes del inicio del tratamiento de segunda línea, para las siguientes variables: porcentaje de linfocitos (40.50 vs 23.07,  $p=0.017$ ), porcentaje de linfocitos T cooperadores de memoria central (CD3+CD4+CCR7+CD45RA-) (0.29 vs 0.00,  $p=0.030$ ), porcentaje de linfocitos T citotóxicos efectores activos (CD3+CD8+CCR7-CD45RA+CD38+HLA-

DR+) (2.91 vs 0.00,  $p=0.030$ ), porcentaje de linfocitos B de memoria (CD3-CD19+CD20+) (15.55 vs 1.94,  $p=0.027$ ), porcentaje de linfocitos T cooperadores (CD3+CD4+) (42.30 vs 14.51,  $p=0.042$ ), porcentaje de linfocitos T cooperadores con expresión de PD-L1 (CD3+CD4+PD-L1+) (0.97 vs 0.25,  $p=0.026$ ), linfocitos T cooperadores Th1 con expresión de PD-L1 (CD3+CD4+CXCR3+CCR6-IFN-R+IL-12R+PD-L1+) (0.75 vs 0.00,  $p=0.30$ ), linfocitos T cooperadores Th1 con expresión de PD-L1 (CD3+CD4+CXCR3+CCR6-PD-L1+) (0.96 vs 0.00,  $p=0.14$ ), porcentaje de linfocitos T cooperadores reguladores vírgenes activos con expresión de PD-1 (CD3+CD4+CCR4+CD25+CD127<sup>low</sup>CD45RO+HLA-DR+PD-1+) (2.44 vs 0.00,  $p=0.030$ ), porcentaje de leucocitos (81.50 vs 61.60,  $p=0.042$ ), porcentaje de células NK con expresión de PD-L1 (CD3-CD19-CD20-CD14-CD56+CD16+ CD161+PD-L1+) (0.83 vs 0.00,  $p=0.019$ ) y porcentaje de leucocitos con expresión de PD-L1 (PD-L1+) (0.40 vs 0.04,  $p=0.027$ ) (**Tabla 18**).

Los valores obtenidos mediante citometría de flujo fueron significativamente menores en los pacientes con SLP corta con respecto a los pacientes con SLP larga, antes del inicio del tratamiento de segunda línea, para las siguientes variables: MFI de PD-1 de linfocitos T con expresión de PD-1 (CD3+PD-1+) (646.50 vs 762.50,  $p=0.042$ ), porcentaje de células plasmáticas (CD3-CD19+CD20-) (32.85 vs 46.60,  $p=0.042$ ) y porcentaje de neutrófilos (CD3-CD19-CD14-CD20-) (7.80 vs 97.35,  $p=0.027$ ) (**Tabla 18**).

Los valores obtenidos mediante citometría de flujo fueron significativamente mayores en los pacientes con SLP corta con respecto a los pacientes con SLP larga, al cuarto ciclo del tratamiento de segunda línea, para las siguientes variables: porcentaje de linfocitos (37.35 vs 26.62,  $p=0.027$ ), porcentaje de linfocitos T cooperadores de memoria efectora inactivos con expresión de PD-1 (CD3+CD4+CCR7-CD45RA-CD38-HLA-DR-PD-1+) (0.091 vs 0.00,  $p=0.031$ ), porcentaje de linfocitos T cooperadores de memoria efectora con expresión de PD-1 (CD3+CD4+CCR7-CD45RA-PD-1+) (0.99 vs 0.00,  $p=0.047$ ), porcentaje de linfocitos T cooperadores con expresión de PD-1 (CD3+CD4+PD-1+) (0.96 vs 0.00,  $p=0.047$ ), porcentaje de linfocitos T citotóxicos efectores activos (CD3+CD8+CCR7-CD45RA+CD38+HLA-DR+) (5.57 vs 0.00,  $p=0.030$ ), porcentaje de linfocitos B de memoria activa con expresión de PD-L1 (CD3-CD19+CD20+CD27+IgD+PD-L1+) (2.17 vs 0.00,  $p=0.030$ ), porcentaje de linfocitos B de memoria con expresión de PD-L1 (CD3-CD19+CD20+PD-L1+) (1.74 vs 0.28,  $p=0.042$ ), porcentaje de linfocitos T cooperadores Th1 inactivos con expresión de PD-1 (CD3+CD4+CXCR3+CCR6-IFN-R+IL-12R+HLA-DR-PD-1+) (4.11 vs 0.00,  $p=0.030$ ), porcentaje de expresión de linfocitos T cooperadores Th17 inactivos (CD3+CD4+CCR6+CXCR3IL-6R+HLA-DR-) (29.15 vs 0.00,  $p=0.030$ ) y linfocitos T cooperadores reguladores vírgenes con expresión de PD-1 (CD3+CD4+CCR4+CD25+CD127<sup>low</sup>CD45RO+PD-1+) (1.46 vs 0.00,  $p=0.047$ ) (**Tabla 18**).

Los valores obtenidos mediante citometría de flujo fueron significativamente menores en los pacientes con SLP corta con respecto a los pacientes con SLP larga, al cuarto ciclo del tratamiento de segunda línea, para las siguientes variables: porcentaje de linfocitos T cooperadores Th2 inactivos (CD3+CD4+CCR6-CXCR3-

CCR4+ IL4R+HLA-DR-) (78.35 vs 93.45, p=0.027) y MFI de PD-1 de leucocitos con expresión de PD-1 (CD3-CD19-PD-1+) (917.50 vs 1044.00, p=0.017) (**Tabla 18**).

No se realizó la comparación entre los pacientes con SLP corta y SLP larga dentro de los grupos de tratamiento porque la n resultó ser muy pequeña para los subgrupos.

**Tabla 16. Comparación de los valores de citometría de flujo entre grupos de tratamiento**

Variable	Total (N=12)	Pembrolizumab + DTX (n=6)	DTX (n=6)	P
	Mediana (min-max)	Mediana (min-max)	Mediana (min-max)	
<b>CTL PD-1+ (%)</b>				
2T	3.865(0.68-22.7)	2.065(0.68-11.5)	17.1(1.56-22.7)	<b>0.037</b>
<b>Linfocitos T PD-1 (%)</b>				
2T	1.315(0.4-23.4)	0.615(0.4-3.27)	2.885(1.29-23.4)	<b>0.016</b>
<b>Linfocitos T PD-1 (MFI)</b>				
2T	645.5(561-2413)	634(561-656)	690.5(639-2413)	<b>0.037</b>
<b>T<sub>reg</sub> (%)</b>				
2T	98.4(80-100)	96.2(80-99.2)	99.9(98.2-100)	<b>0.024</b>
<b>CD plasmocitoides PD-1+ (%)</b>				
2T	9.365(0-31)	5.025(0-23.5)	11.35(9.29-31)	<b>0.037</b>
<b>Neutrófilos PD-1+ (%)</b>				
2T	9.27(2.78-29.5)	6.225(2.78-19.6)	10.875(9.14-29.5)	<b>0.037</b>

DTX: docetaxel; Min: mínimo; Max: máximo; MFI: intensidad media de fluorescencia; CTL: linfocitos T citotóxicos; <sub>reg</sub>: regulatorios; CD: células dendríticas. Las comparaciones entre grupos de tratamiento se realizaron mediante la prueba de Mann-Withney.

Tabla 17. Comparación de los valores de citometría de flujo entre grupos de pacientes estratificados de acuerdo con la respuesta

Variable	Total		P	Pembrolizumab + DTX		P
	NR n=7	R n=5		NR n=3	R n=3	
	Mediana (min-max)	Mediana (min-max)		Mediana (min-max)	Mediana (min-max)	
<b>Linfocitos T<sub>hem</sub> inactivos PD-1+ (%)</b>						
1T	1.64(0-3.74)	0(0-1.34)	0.098	0.28(0.18-2.33)	0(0-0.37)	0.268
2T	1.15(0-33.3)	0(0-0.39)	<b>0.032</b>	0.36(0-0.68)	0.22(0-0.39)	0.658
<b>Linfocitos T<sub>hem</sub> PD-1+ (%)</b>						
1T	1.69(0-3.75)	0.47(0-2.92)	0.368	0.34(0.17-2.22)	0.47(0-0.87)	0.827
2T	1.06(0-33.3)	0(0-0.46)	<b>0.021</b>	0.62(0-0.93)	0.21(0-0.46)	0.376
<b>Linfocitos T<sub>h</sub> PD-1+ (%)</b>						
1T	1.79(0-4.24)	0.49(0-2.92)	0.515	0.4(0.16-2.22)	0.49(0.26-0.83)	0.827
2T	1(0-33.3)	0(0-0.33)	<b>0.021</b>	0.62(0-0.92)	0.25(0-0.33)	0.376
<b>CTL de memoria central (%)</b>						
1T	0.32(0-8.33)	0(0-0)	<b>0.024</b>	0.18(0-0.32)	0(0-0)	0.121
2T	0(0-1.56)	0(0-0)	0.212	0(0-0)	0(0-0)	1.000
<b>Linfocitos T PD-L1+ (MFI)</b>						
1T	646(556-677)	761(647-1300)	<b>0.019</b>	662(592-677)	761(647-1300)	0.275
2T						
<b>MBC PD-L1+ (MFI)</b>						
1T						
2T	262(222-338)	236(204-253)	0.088	293(262-338)	253(236-253)	<b>0.046</b>
<b>Células plasmáticas PD-1+ (%)</b>						
1T						
2T	0(0-9.55)	0.33(0-0.5)	0.208	0(0-0)	0.33(0.33-0.5)	<b>0.034</b>
<b>Linfocitos B vírgenes PD-1+ (%)</b>						
1T	3.84(0.07-7.26)	0.11(0.06-1.64)	<b>0.042</b>	1.87(0.36-3.84)	0.11(0.06-0.15)	<b>0.050</b>
2T	0.9(0.14-6.76)	0.19(0.08-4.67)	0.062	0.9(0.25-4.95)	0.11(0.08-0.2)	<b>0.050</b>
<b>Linfocitos T<sub>h1</sub> activos PD-L1+ (%)</b>						
1T	0(0-7.14)	0(0-4.76)	0.385	0(0-5.56)	0(0-4.76)	0.796
2T	3.7(0-16.7)	0(0-5.88)	0.311	5.88(5-16.7)	0(0-2.04)	<b>0.046</b>
<b>Linfocitos T<sub>h1</sub> inactivos PD-1+ (%)</b>						
1T	2.38(0-12)	1.43(0-5.71)	0.567	0.93(0.88-2.38)	1.43(0-4.85)	0.827
2T	6.67(0-16.6)	0(0-0.82)	<b>0.046</b>	1.56(0-6.67)	0(0-0.82)	0.246
<b>Linfocitos T<sub>h</sub> PD-1+ (%)</b>						
1T	1.92(0-10)	1.31(0-7.89)	0.368	1.57(1.52-1.92)	1.31(0-5.52)	0.513
2T	6.9(0-17.4)	0(0-1.06)	<b>0.021</b>	3.92(1.19-8.06)	0.8(0-1.06)	<b>0.050</b>
<b>Linfocitos T<sub>h2</sub> (%)</b>						
1T	29(20.5-50)	18.7(0-29.4)	<b>0.042</b>	23.7(20.5-32.9)	18.7(0-22)	0.127
2T	25(0-33.3)	24.3(20-33.3)	0.807	24.2(22.4-27)	22.4(20-24.3)	0.376
<b>Linfocitos T<sub>h2</sub> activos (%)</b>						
1T	15.7(9.09-100)	5.62(0-18.6)	<b>0.042</b>	23.5(14.1-27.9)	5.62(0-18.6)	0.127
2T	19.1(0-27.3)	6.6(0-22.4)	0.220	19.1(13.1-20.9)	6.6(0-22.4)	0.513

Variable	Total		P	Pembrolizumab + DTX		P
	NR	R		NR	R	
	n=7	n=5		n=3	n=3	
	Mediana (min-max)	Mediana (min-max)		Mediana (min-max)	Mediana (min-max)	
<b>Linfocitos T<sub>h17</sub> (%)</b>						
1T	87.5(0-100)	50(0-100)	0.497	60(50-100)	50(0-100)	0.500
2T	85.7(0-100)	50(0-87.5)	0.083	100(60-100)	50(0-50)	<b>0.043</b>
<b>T<sub>reg</sub> de memoria activos (%)</b>						
1T	25(0-33.3)	0(0-26.7)	0.069	27.5(14.8-33.3)	0(0-26.7)	0.121
2T	28.6(0-40)	10.2(0-26.7)	0.060	28.6(28.6-40)	10.2(0-26.7)	<b>0.046</b>
<b>T<sub>reg</sub> de memoria activos PD-1+ (%)</b>						
1T	0(0-33.3)	0(0-100)	0.786	0(0-21.4)	0(0-25)	0.796
2T	33.3(0-100)	0(0-20)	<b>0.046</b>	33.3(0-50)	0(0-20)	0.246
<b>T<sub>reg</sub> de memoria PD-L1+ (%)</b>						
1T	0(0-7.84)	0(0-6.67)	0.499	0(0-7.84)	0(0-6.67)	0.796
2T	6.67(0-33.3)	0(0-6.25)	0.069	7.14(6.67-14.3)	0(0-2.04)	<b>0.046</b>
<b>T<sub>reg</sub> vírgenes inactivos PD-1+ (%)</b>						
1T	0.62(0-3.8)	0.69(0-2.99)	0.933	0(0-0.62)	0.69(0-1.32)	0.246
2T	2.17(0-8.74)	0(0-0.53)	<b>0.015</b>	1.56(1.48-2.17)	0(0-0.53)	<b>0.046</b>
<b>T<sub>reg</sub> vírgenes PD-1+ (%)</b>						
1T	0.75(0-3.75)	0.92(0-2.74)	0.934	0.49(0-0.75)	0.92(0-1.53)	0.376
2T	1.71(0-9.57)	0(0-0.69)	<b>0.021</b>	1.22(1.16-1.71)	0.58(0-0.69)	<b>0.050</b>
<b>T<sub>reg</sub> PD1+ (%)</b>						
1T	1.97(0-6.21)	1.23(0-6.02)	0.462	1.45(0.85-1.97)	1.23(0-2.08)	0.827
2T	4.51(0-18.4)	0.59(0-1.59)	<b>0.041</b>	3.11(1.14-4.51)	1.02(0-1.59)	0.127
<b>T<sub>reg</sub> PD-L1+ (%)</b>						
1T	0(0-0.93)	0(0-0.46)	0.526	0(0-0.88)	0.25(0-0.46)	0.817
2T	0.75(0-1.69)	0(0-0.59)	<b>0.047</b>	0.75(0.38-1.04)	0(0-0.2)	<b>0.046</b>
<b>Células NK PD-1+ (%)</b>						
1T	8.74(0-26.8)	4.84(0-12.5)	0.329	8.31(3.2-26.8)	5.35(1.22-12.5)	0.513
2T	13.4(5.58-30.2)	3.12(0-8.74)	<b>0.012</b>	10.1(5.58-20.7)	3.12(0-5.82)	0.127
<b>CD mieloides PD-1+ (%)</b>						
1T	0(0-18)	1.75(0.47-16.7)	0.109	0(0-0)	0.47(0.47-16.7)	<b>0.034</b>
2T	0.47(0-8.14)	0.78(0-7.89)	0.620	0(0-0.48)	0.44(0-7.89)	0.487
<b>Neutrófilos PD-1+ (%)</b>						
1T	7.64(2.84-16.9)	2.78(0-6.45)	<b>0.042</b>	7.64(2.84-16.9)	2.78(1.25-6.45)	0.127
2T	12.1(4.68-29.5)	7.69(2.78-9.4)	0.062	8.6(4.68-19.6)	4.76(2.78-7.69)	0.275
<b>Monocitos PD-1+ (%)</b>						
1T	1.75(0-20)	0(0-0)	0.053	1.75(0-11.1)	0(0-0)	0.121
2T	4.91(0-50)	0(0-0.42)	<b>0.015</b>	3.03(0.55-50)	0(0-0.42)	<b>0.046</b>

DTX: docetaxel; Min: mínimo; Max: máximo; MFI: intensidad media de fluorescencia; h: cooperadores; em: memoria efectora; CTL: linfocitos T citotóxicos; MBC células B de memoria; reg: regulatorios; NK; asesinas naturales; CD: células dendríticas. Las comparaciones entre grupos de tratamiento se realizaron mediante la prueba de Mann-Whitney.

**Tabla 18. Comparación de los valores de citometría de flujo entre grupos de pacientes estratificados de acuerdo con la duración de la SLP**

Variable	Total		P
	SLP corta (n=8)	SLP larga (n=4)	
	Mediana (min-max)	Mediana (min-max)	
<b>Linfocitos (%)</b>			
1T	40.5(22.65-54.1)	23.075(18.2-30.8)	<b>0.017</b>
2T	37.35(25.45-52.8)	26.625(19.7-35)	<b>0.027</b>
<b>Linfocitos T<sub>hcm</sub> (%)</b>			
1T	0.295(0-1.21)	0(0-0)	<b>0.030</b>
2T	0.52(0-1.42)	0(0-1.2)	0.291
<b>Linfocitos T<sub>hem</sub> inactivos PD-1+ (%)</b>			
1T	0.325(0-3.74)	0.67(0-2.33)	0.604
2T	0.915(0-33.3)	0(0-0.36)	<b>0.031</b>
<b>Linfocitos T<sub>hem</sub> PD-1+ (%)</b>			
1T	0.405(0-3.75)	1.545(0-2.92)	0.732
2T	0.995(0-33.3)	0(0-0.62)	<b>0.047</b>
<b>Linfocitos T<sub>h</sub> PD-1+ (%)</b>			
1T	0.445(0-4.24)	1.525(0-2.92)	0.799
2T	0.96(0-33.3)	0(0-0.62)	<b>0.047</b>
<b>CTL efectores activos (%)</b>			
1T	2.91(0-18.8)	0(0-0)	<b>0.030</b>
2T	5.57(0-24.8)	0(0-0)	<b>0.030</b>
<b>Linfocitos T PD-L1+ (MFI)</b>			
1T	646.5(556-761)	762.5(662-1300)	<b>0.042</b>
2T			
<b>MBC (%)</b>			
1T	15.55(3.26-41.2)	1.94(1.22-5.54)	<b>0.027</b>
2T	14.1(7.49-42.3)	9.085(4.99-17.4)	0.126
<b>MBC activos PD-L1+ (%)</b>			
1T	1.28(0-3.62)	0.945(0-5.56)	0.863
2T	2.17(0-5.88)	0(0-0)	<b>0.030</b>
<b>MBC PD-L1+ (%)</b>			
1T	0.91(0-1.67)	0.88(0.68-3.09)	0.497
2T	1.745(0.09-2.47)	0.285(0.1-0.79)	<b>0.042</b>
<b>Células plasmáticas (%)</b>			
1T	32.85(16.6-51.2)	46.6(41-51.3)	<b>0.042</b>
2T	35.7(16.3-42.6)	42.65(28.2-47.2)	0.174
<b>Linfocitos T<sub>h</sub> (%)</b>			
1T	42.3(2.4-57)	14.515(0.93-41)	<b>0.042</b>
2T	42.2(1.85-57.5)	14.24(3.61-55.9)	0.308
<b>Linfocitos T<sub>h</sub> PD-L1+ (%)</b>			
1T	0.97(0-1.63)	0.255(0-0.62)	<b>0.026</b>
2T	1.225(0-2.28)	0.365(0-2.15)	0.231

Variable	Total		P
	SLP corta (n=8)	SLP larga (n=4)	
	Mediana (min-max)	Mediana (min-max)	
<b>Linfocitos T<sub>h1</sub> inactivos PD-1+ (%)</b>			
1T	2.505(0-12)	1.19(0-5.71)	0.392
2T	4.115(0-16.6)	0(0-0)	<b>0.030</b>
<b>Linfocitos T<sub>h1</sub> PD-1+ (%)</b>			
1T	2.855(0-10)	0.96(0-7.89)	0.392
2T	4.045(0-17.4)	0(0-3.92)	0.069
<b>Linfocitos T<sub>h1</sub> PD-L1+ (%)</b>			
1T	0.75(0-3.45)	0(0-0)	<b>0.030</b>
2T	1.52(0-2.98)	0.52(0-5.88)	0.604
<b>Linfocitos T<sub>h2</sub> inactivos (%)</b>			
1T	85.1(0-94.4)	36.05(0-90)	0.171
2T	78.35(0-93.4)	93.45(86.4-100)	<b>0.027</b>
<b>Linfocitos T<sub>h17</sub> inactivos (%)</b>			
1T	0(0-100)	0(0-20)	0.613
2T	29.15(0-100)	0(0-0)	<b>0.030</b>
<b>T<sub>reg</sub> vírgenes activos PD-1+ (%)</b>			
1T	2.44(0-3.57)	0(0-0)	<b>0.030</b>
2T	0.895(0-12.7)	0(0-0)	0.106
<b>T<sub>reg</sub> vírgenes PD-1+ (%)</b>			
1T	1.065(0-3.75)	0(0-2.74)	0.195
2T	1.465(0-9.57)	0(0-1.16)	<b>0.047</b>
<b>Leucocitos (%)</b>			
1T	81.05(52.7-88.6)	61.6(53.7-68)	<b>0.042</b>
2T	82.3(65.3-94.3)	69.35(58.9-74.4)	0.074
<b>Células NK PD-L1 (%)</b>			
1T	0.83(0-8.33)	0(0-0.17)	<b>0.019</b>
2T	1.135(0-27.9)	0.255(0-0.69)	0.060
<b>Neutrófilos (%)</b>			
1T	77.8(57-91.9)	97.35(84.5-97.9)	<b>0.027</b>
2T	79.4(57.4-84.7)	90.65(63.4-94.8)	0.126
<b>Leucocitos PD-1+ (MFI)</b>			
1T	951(849-1150)	1024.5(970-1083)	0.174
2T	917.5(861-1035)	1044(1021-1107)	<b>0.017</b>
<b>Leucocitos PD-L1+ (%)</b>			
1T	0.405(0.15-1.09)	0.0475(0.04-0.35)	<b>0.027</b>
2T	0.565(0.17-1.3)	0.0785(0.03-0.67)	0.062

DTX: docetaxel; Min: mínimo; Max: máximo; MFI: intensidad media de fluorescencia; h:cooperadores; cm: memoria central; em: memoria efectora; CTL: linfocitos T citotóxicos; MBC: células B de memoria; reg: regulatorios; NK: asesinas naturales. Las comparaciones entre grupos de tratamiento se realizaron mediante la prueba de Mann-Withney.

## VII. DISCUSIÓN

---

Las características clínicas de los pacientes incluidos en este subanálisis son similares a las reportadas en el ensayo clínico PROLUNG [53]. Por lo tanto, los pacientes incluidos en este subanálisis pueden considerarse una muestra representativa de la población incluida en dicho ensayo y, a pesar de la incertidumbre asociada con estimaciones basadas en muestreos, los resultados obtenidos en este proyecto reflejan el comportamiento de la población total. Así mismo, a excepción de la concentración de albúmina, las características clínicas basales de los pacientes indican que el grupo control (DTX) y el grupo experimental (DTX + pembrolizumab) se encuentran balanceados, es decir, no hubo diferencias significativas en cuanto a las características clínicas basales entre los grupos de tratamiento, al igual que en el ensayo PROLUNG. Lo cual se esperaba debido a la aleatorización del ensayo. Esto confirma la representatividad de la muestra y señala únicamente a la concentración basal de albúmina en los pacientes como un posible factor de confusión al momento del submuestreo.

Estudios previos a este han evaluado poblaciones de células inmunes en sangre como biomarcadores pronósticos y/o predictivos en pacientes con CPCNP tratados con cirugía, radioterapia, quimioterapia basada en platinos o ICIs que interfieren con la vía PD-1/PD-L1 [58]. Sin embargo, no existen estudios anteriores en los que se evalúe el potencial pronóstico y/o predictivo de estos parámetros en pacientes tratados con inmunoterapia en combinación con quimioterapia.

En este estudio, al estratificar a los pacientes de acuerdo con la respuesta y el grupo de tratamiento, se encontró que el conteo absoluto de neutrófilos, después de cuarto ciclo de tratamiento de segunda línea, es significativamente mayor en los NR con respecto a los R, sin importar el tratamiento asignado. El hecho de que esta diferencia no fue significativa dentro de cada grupo de tratamiento podría deberse a que, al estratificar a los pacientes de acuerdo con tratamiento asignado, se reduce el tamaño de la muestra. Sin embargo, los resultados apoyan la idea de que el conteo absoluto de neutrófilos, después del cuarto ciclo de tratamiento, es un buen predictor de la respuesta, por lo que podría servir como un biomarcador de monitoreo pronóstico de la respuesta para pacientes con CPCNP. Estos resultados son consistentes con reportes de que los neutrófilos tiene un papel importante en la inflamación y la actividad inmunológica que ocurre en el microambiente tumoral, ya que los factores de crecimiento liberados por las células neoplásicas promueven la producción de neutrófilos, y los neutrófilos circulantes secretan VEGF, TNF- $\alpha$  y diferentes interleucinas que contribuyen a la progresión tumoral [59], además los neutrófilos infiltrantes en el tumor son capaces de promover la progresión tumoral al secretar factores que promueven la angiogénesis, estimulan la motilidad, migración e invasión celular y generar un ambiente inmunosupresor en el microambiente tumoral [60].

En el análisis de SLP se encontró que en el grupo de pacientes tratados con pembrolizumab en combinación con DTX, después del cuarto ciclo de la terapia de segunda línea, el conteo de plaquetas es significativamente mayor en aquellos pacientes con SLP corta con respecto a los pacientes con SLP larga, además se obtuvo que este es un buen predictor de la duración de la SLP. Los resultados de este estudio apoyan la idea de que el conteo absoluto de plaquetas podría servir como un biomarcador de monitoreo predictivo de la duración de la SLP en pacientes con CPCNP tratados con pembrolizumab en combinación con docetaxel. Es importante destacar que el punto de corte utilizado para separar a los pacientes por el conteo absoluto de plaquetas en alto ( $>332$  miles/mm<sup>3</sup>) y bajo es similar al punto de corte establecido en el manual Merck de diagnóstico para la trombocitosis ( $>350$  miles/mm<sup>3</sup>), por lo que también podría utilizarse a la trombocitosis como un factor predictivo de la duración de la SLP en estos pacientes. Estos resultados coinciden con estudios que han demostrado el rol de las plaquetas en el desarrollo tumoral. Se sabe que la progresión tumoral depende en parte de la angiogénesis, sin embargo, sólo una pequeña proporción de los factores que regulan la angiogénesis circulan libremente en la sangre, la mayoría de estos factores como el VEGF, factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor plaquetario 4 (PF4), trombospondina 1 (TSP-1) y endostatina son liberados por las plaquetas directamente en el microambiente tumoral y un estudio reciente demostró que las plaquetas de pacientes con cáncer colorrectal tienen un contenido significativamente mayor de los factores proangiogénicos PDGF, PF4 y VEGF que las plaquetas de sujetos sanos [61].

Los resultados de este estudio también muestran una tendencia a que el RNL y el RPL sean mayores en los pacientes sin RO con respecto a aquellos con RO, así como en los pacientes con SLP corta con respecto a aquellos con SLP larga. Esto concuerda con estudios que han reportado que el RPL y RNL podrían ser indicadores de la respuesta inflamatoria sistémica producida como respuesta al cáncer, la cual juega un papel clave en el desarrollo y progresión en muchos tipos de cáncer [58, 62]. Adicionalmente, diversos estudios realizados en pacientes con CPCNP tratados con quimiorradioterapia como terapia de primera línea o nivolumab como terapia de segunda línea, han demostrado que el RNL elevado antes del inicio del tratamiento está significativamente asociado con peores tasas de respuesta [55, 63, 64]. Así mismo, se ha observado una tendencia a que la SLP sea más corta en aquellos pacientes con un RNL elevado [55, 63, 64]. De igual forma, diversos estudios realizados en pacientes con CPCNP tratados con nivolumab como terapia de segunda línea y metaanálisis, han demostrado que el RPL elevado antes del inicio del tratamiento está significativamente asociado con peores tasas de respuesta y una supervivencia global (SG) más corta [55, 62-64]. Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales en poblaciones más grandes, para poder identificar si la evaluación del RNL, así como del RPL, puede servir como factor pronóstico y/o predictivo de la respuesta y/o duración

de la SLP en pacientes con CPCNP tratados con pembrolizumab en combinación con DTX o DTX como monoterapia.

Aunque en este estudio no se encontraron diferencias significativas en la concentración de ACE ni antes del inicio ni al cuarto ciclo del tratamiento entre los pacientes con RO y aquellos sin RO ni entre los pacientes con SLP larga y aquellos con SLP corta, sí se observó una diferencia significativa en el cambio de antes del inicio al cuarto ciclo del tratamiento entre los pacientes con RO y aquellos sin RO tratados con pembrolizumab en combinación con DTX. Adicionalmente, se encontraron diferencias significativas en la concentración de ACE entre los pacientes con SLP larga y aquellos con SLP corta tratados con DTX. Estos resultados sugieren el posible rol de la concentración de ACE en sangre como un biomarcador de monitoreo de la respuesta en pacientes con CPCNP tratados con ICIs en combinación con quimioterapia como tratamiento de segunda línea. lo cual concuerda con que el ACE es una glicoproteína involucrada en la modulación de la proliferación celular, reconocimiento célula-célula y adhesión celular y, se ha observado un aumento en la concentración de esta glicoproteína en sangre en pacientes con cáncer colorrectal, de mamá y de pulmón [65, 66]. Sin embargo, su rol como biomarcador predictivo, pronóstico o de monitoreo en pacientes con CPCNP no ha sido bien establecido.

Al igual que en este estudio, en otro estudio realizado en pacientes con CPCNP tratados con nivolumab como tratamiento de segunda línea, se encontró que, aunque los niveles de ACE previos al inicio del tratamiento de segunda línea no difieren significativamente entre los pacientes con respuesta global (RG) y aquellos sin RG, el cambio en la concentración de ACE en sangre de antes del inicio al cuarto ciclo del tratamiento de segunda línea es significativamente diferente entre los pacientes con RG y aquellos sin RG (-9.0 vs 31.0,  $p=0.005$ ). De manera similar, no se reportó una asociación entre los niveles de ACE previos al inicio del tratamiento de segunda línea y la SLP, pero aquellos pacientes cuyos niveles de ACE tuvieron una reducción  $>20\%$  después de cuarto ciclo de nivolumab tuvieron una SLP más prolongada (7.1 vs 1.7,  $p=0.028$ ) [65]. En otro estudio realizado en pacientes con CPCNP tratados con quimioterapia basada en platino como tratamiento de primera línea se observó una asociación significativa el incremento de la concentración de ACE  $>20\%$  durante el tratamiento y una SG más corta [66].

En este estudio, se identificaron diferencias significativas en el porcentaje y/o MFI de algunas subpoblaciones de células del sistema inmune en sangre periférica, incluyendo a algunas que producen PD-1 y PD-L1, entre pacientes de los diferentes grupos de tratamiento, entre pacientes con RO y aquellos sin RO, y entre pacientes con SLP larga y aquellos con SLP corta. Particularmente en subpoblaciones de linfocitos T y B, células plasmáticas, células NK, neutrófilos y monocitos. En general, las subpoblaciones en el grupo tratado con DTX presentan una mayor abundancia de PD-1 y PD-L1 que las del grupo tratado con la combinación de pembrolizumab con DTX, las subpoblaciones en el grupo de NR presentan una mayor abundancia de PD-1 y

PD-L1 que las del grupo de R, y las subpoblaciones en el grupo con SLP corta presentan una mayor abundancia de PD-1 y PD-L1 que las del grupo con SLP larga. Esto sugiere que la abundancia en sangre de estas subpoblaciones podría estar asociada con la RO y la SLP. Aunque algunas de las subpoblaciones en las que se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos ya han sido previamente reportadas como potenciales biomarcadores de pronóstico y/o predictivos en pacientes con CPCNP, este es el primer estudio en el que se evalúa a un espectro tan amplio de subpoblaciones de células del sistema inmune en sangre periférica. Algunos estudios previos han evaluado el potencial como biomarcador pronóstico y predictivo, de la respuesta a ICIs en pacientes con CPCNP, de la identificación mediante citometría de flujo de unas cuantas poblaciones de células inmunes circulantes en sangre periférica, especialmente de los linfocitos T [52, 67, 68]. Sin embargo, a pesar de la facilidad con la que se puede obtener una muestra de sangre, aún falta por estudiar el potencial como biomarcador pronóstico, predictivo y/o de monitoreo de muchas de estas poblaciones.

En un estudio previo realizado en pacientes con CPCNP en estadio avanzado en tratamiento con nivolumab, se encontró que los pacientes con RG tenían un mayor número de células NK y linfocitos T CD8+ PD-1+ circulantes en sangre periférica antes del inicio del tratamiento que aquellos pacientes que no tuvieron RG ( $p < 0.01$ ;  $p < 0.05$ ). Así mismo, en este estudio se observó una mayor SG ( $p = 0.014$ ) y SLP ( $p = 0.025$ ) en aquellos pacientes con un alto número de células NK circulantes ( $< 202/\mu\text{l}$ ). De igual manera se observó que aquellos pacientes con RG tuvieron un incremento en el número de células NK, linfocitos T y linfocitos T CD4+ circulantes durante el tratamiento con nivolumab [52]. En otro estudio realizado en pacientes con CPCNP con estadios avanzados tratados con pembrolizumab, nivolumab y atezolizumab se encontró una asociación entre un porcentaje alto de células inmunes circulantes con expresión de PD-L1 ( $> 30\%$ ), bajo porcentaje de linfocitos T CD4+, alto porcentaje de monocitos PD-L1+ y la RO [67]. En otro estudio realizado en pacientes con CPCNP con estadios avanzados tratados con atezolizumab se encontró una asociación entre un alto porcentaje de linfocitos T CD4+ con expresión de PD-1 ( $> 12.27\%$ ) y una menor SG (397 días vs. 721 días,  $p = 0.028$ ) y SLP (88 días vs. 391 días,  $p = 0.044$ ) [68].

El hecho de que en los análisis de regresión logística no se haya encontrado una asociación entre las subpoblaciones de células inmunes, analizadas por citometría de flujo, y la respuesta o la SLP, podría indicar que la asociación que existe entre la frecuencia de las diferentes subpoblaciones y la respuesta o la SLP no es lineal, que la abundancia de las diferentes subpoblaciones no es un buen predictor de la respuesta o de la SLP, o que es necesario incluir a más pacientes en el estudio para que la prueba estadística encuentre la asociación. Por último, es importante tener en cuenta que, al ser un estudio realizado en una población pequeña, es muy probable que algunos de los resultados obtenidos estén sesgados debido al error de muestreo. Sin embargo, los resultados de este estudio servirán como base para el diseño de un panel dirigido hacia las subpoblaciones que resultaron de interés para realizar la inmunofenotipificación de un grupo más grande de pacientes.

## VIII. CONCLUSIONES

---

1. El conteo absoluto de neutrófilos elevado, después del cuarto ciclo de tratamiento con docetaxel o pembrolizumab en combinación con docetaxel, está significativamente asociado con una peor respuesta en pacientes con CPCNP.
2. El conteo absoluto de plaquetas elevado, después del cuarto ciclo de tratamiento con pembrolizumab en combinación con docetaxel, está significativamente asociado con una SLP más corta en pacientes con CPCNP.
3. Los pacientes tratados con pembrolizumab en combinación con docetaxel y sin RO, tienen concentraciones elevadas de ACE en sangre, tanto antes del inicio como durante el tratamiento. Mientras que, en aquellos con RO hay una disminución de la concentración de ACE en sangre durante el tratamiento.
4. Los pacientes tratados con docetaxel y con SLP corta, tienen una concentración de ACE en sangre significativamente más elevada que aquellos pacientes con SLP larga.
5. Existen diferencias significativas en el porcentaje y/o MFI de muchas subpoblaciones de células inmunes circulantes en sangre periférica, incluyendo poblaciones con las proteínas PD-1 y PD-L1, entre los diferentes grupos estudiados, especialmente en subpoblaciones de linfocitos T y B, células plasmáticas, células NK, neutrófilos y monocitos, evaluadas antes y durante el tratamiento, lo que resalta el potencial que tienen estas células para pronosticar, predecir y/o monitorear el curso de la enfermedad en pacientes con CPCNP.
6. Es necesario confirmar estos resultados en estudios adicionales en los que se incluya a un mayor número de pacientes, además de ensayos clínicos en los que se demuestre que al asignar el tratamiento con ICIs con base en estos parámetros se obtiene un mayor beneficio clínico para los pacientes. Sin embargo, eventualmente esta información podría ser utilizada por los médicos oncólogos como una herramienta para decidir si un paciente con CPCNP debería ser tratado con ICIs.

## IX. REFERENCIAS

---

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
2. Fouad, Y.A. and C. Aanei, *Revisiting the hallmarks of cancer*. Am J Cancer Res, 2017. **7**(5): p. 1016-1036.
3. Talmadge, J.E. and I.J. Fidler, *AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective*. Cancer Res, 2010. **70**(14): p. 5649-69.
4. Ehrlich, P., *Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung*. Ned. Tijdschr. Geneesk, 1909. **5**: p. 273-90.
5. Cavallo, F., et al., *2011: the immune hallmarks of cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2011. **60**(3): p. 319-26.
6. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**(1): p. 329-60.
7. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. Science, 2011. **331**(6024): p. 1565-70.
8. MacKie, R.M., R. Reid, and B. Junor, *Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery*. N Engl J Med, 2003. **348**(6): p. 567-8.
9. Xiao, D., et al., *Donor cancer transmission in kidney transplantation: a systematic review*. Am J Transplant, 2013. **13**(10): p. 2645-52.
10. Gomes, M., et al., *The role of inflammation in lung cancer*, in *Adv Exp Med Biol*. 2014. p. 1-23.
11. Shiels, M.S., et al., *Circulating Inflammation Markers and Prospective Risk for Lung Cancer*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 2013. **105**(24): p. 1871-1880.
12. Kaplan, D.H., et al., *Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7556-61.
13. Knuth, A., et al., *T-cell-mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma: analysis with interleukin 2-dependent T-cell cultures*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(11): p. 3511-5.
14. van der Bruggen, P., et al., *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. Science, 1991. **254**(5038): p. 1643-7.
15. Sahin, U., et al., *Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(25): p. 11810-3.
16. Shankaran, V., et al., *IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1107-11.
17. Duan, Q., et al., *Turning Cold into Hot: Firing up the Tumor Microenvironment*. Trends Cancer, 2020. **6**(7): p. 605-618.
18. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 991-8.
19. Guerra, N., et al., *NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy*. Immunity, 2008. **28**(4): p. 571-80.
20. Sims, G.P., et al., *HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 367-88.
21. Malladi, S., et al., *Metastatic Latency and Immune Evasion through Autocrine Inhibition of WNT*. Cell, 2016. **165**(1): p. 45-60.
22. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 137-48.
23. Browning, M.J., et al., *Tissue typing the HLA-A locus from genomic DNA by sequence-specific PCR: comparison of HLA genotype and surface expression on colorectal tumor cell lines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(7): p. 2842-5.
24. Ramachandran, I.R., et al., *Myeloid-derived suppressor cells regulate growth of multiple myeloma by inhibiting T cells in bone marrow*. J Immunol, 2013. **190**(7): p. 3815-23.
25. Toor, S.M., et al., *Immune Checkpoints in Circulating and Tumor-Infiltrating CD4+ T Cell Subsets in Colorectal Cancer Patients*. Frontiers in Immunology, 2019. **10**.
26. Darvin, P., et al., *Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers*. Experimental & Molecular Medicine, 2018. **50**(12): p. 1-11.
27. Yoneda, K., et al., *Immune Checkpoint Inhibitors (ICIs) in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)*. Journal of UOEH, 2018. **40**(2): p. 173-189.
28. Dyck, L. and K.H.G. Mills, *Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases*. European Journal of Immunology, 2017. **47**(5): p. 765-779.
29. Saab, S., et al., *Insights Into Lung Cancer Immune-Based Biology, Prevention, and Treatment*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 159.
30. Tsoukalas, N., et al., *PD-1 and PD-L1 as immunotherapy targets and biomarkers in non-*

- small cell lung cancer. *J BUON*, 2019. **24**(3): p. 883-888.
31. (IARC), W.H.O.I.A.f.R.o.C., *GLOBOCAN 2020: estimated lung cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2020*. 2020.
  32. (IARC), W.H.O.I.A.f.R.o.C., *GLOBOCAN 2020: estimated cancer incidence, mortality and prevalence in Mexico in 2020*. 2020.
  33. Arrieta, O., et al., *Lung Cancer in Mexico*. *Journal of Thoracic Oncology*, 2019. **14**(10): p. 1695-1700.
  34. Zheng, M., *Classification and Pathology of Lung Cancer*. *Surg Oncol Clin N Am*, 2016. **25**(3): p. 447-68.
  35. Lynch, T.J., et al., *Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(21): p. 2129-39.
  36. Paez, J.G., et al., *EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy*. *Science*, 2004. **304**(5676): p. 1497-500.
  37. Shaw, A.T., et al., *Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer*. *N Engl J Med*, 2013. **368**(25): p. 2385-94.
  38. Shaw, A.T., et al., *Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(21): p. 1963-71.
  39. Hyman, D.M., et al., *Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(8): p. 726-36.
  40. Herbst, R.S., D. Morgensztern, and C. Boshoff, *The biology and management of non-small cell lung cancer*. *Nature*, 2018. **553**(7689): p. 446-454.
  41. Durm, G. and N. Hanna, *Second-Line Chemotherapy and Beyond for Non-Small Cell Lung Cancer*. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 2017. **31**(1): p. 71-81.
  42. Gandhi, L., et al., *Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer*. *New England Journal of Medicine*, 2018. **378**(22): p. 2078-2092.
  43. Paz-Ares, L., et al., *Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer*. *New England Journal of Medicine*, 2018. **379**(21): p. 2040-2051.
  44. Reck, M., et al., *Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer*. *New England Journal of Medicine*, 2016. **375**(19): p. 1823-1833.
  45. Garon, E.B., et al., *Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer*. *New England Journal of Medicine*, 2015. **372**(21): p. 2018-2028.
  46. Chen, Y.B., C.Y. Mu, and J.A. Huang, *Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study*. *Tumori*, 2012. **98**(6): p. 751-5.
  47. Yang, C.Y., et al., *Programmed cell death-ligand 1 expression in surgically resected stage I pulmonary adenocarcinoma and its correlation with driver mutations and clinical outcomes*. *Eur J Cancer*, 2014. **50**(7): p. 1361-9.
  48. Zhang, Y., et al., *Protein expression of programmed death 1 ligand 1 and ligand 2 independently predict poor prognosis in surgically resected lung adenocarcinoma*. *Onco Targets Ther*, 2014. **7**: p. 567-73.
  49. Merino, D.M., et al., *Establishing guidelines to harmonize tumor mutational burden (TMB): in silico assessment of variation in TMB quantification across diagnostic platforms: phase I of the Friends of Cancer Research TMB Harmonization Project*. *J Immunother Cancer*, 2020. **8**(1).
  50. Samstein, R.M., et al., *Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types*. *Nature Genetics*, 2019. **51**(2): p. 202-206.
  51. Rizvi, H., et al., *Molecular Determinants of Response to Anti-Programmed Cell Death (PD)-1 and Anti-Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) Blockade in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Profiled With Targeted Next-Generation Sequencing*. *Journal of Clinical Oncology*, 2018. **36**(7): p. 633-641.
  52. Mazzaschi, G., et al., *The circulating pool of functionally competent NK and CD8+ cells predicts the outcome of anti-PD1 treatment in advanced NSCLC*. *Lung Cancer*, 2019. **127**: p. 153-163.
  53. Arrieta, O., et al., *Efficacy and Safety of Pembrolizumab Plus Docetaxel vs Docetaxel Alone in Patients With Previously Treated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: The PROLUNG Phase 2 Randomized Clinical Trial*. *JAMA Oncol*, 2020. **6**(6): p. 856-864.
  54. Tanizaki, J., et al., *Peripheral Blood Biomarkers Associated with Clinical Outcome in Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Nivolumab*. *Journal of Thoracic Oncology*, 2018. **13**(1): p. 97-105.
  55. Facchinetti, F., et al., *Clinical and hematologic parameters address the outcomes of non-small-cell lung cancer patients treated with nivolumab*. *Immunotherapy*, 2018. **10**(8): p. 681-694.
  56. Barrera, L., et al., *Levels of peripheral blood polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells and selected cytokines are potentially prognostic of disease progression*

- for patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 2018. **67**(9): p. 1393-1406.
57. Arrieta, O., et al., *Expression of PD-1/PD-L1 and PD-L2 in peripheral T-cells from non-small cell lung cancer patients*. *Oncotarget*, 2017. **8**(60): p. 101994-102005.
  58. Prelaj, A., et al., *Predictive biomarkers of response for immune checkpoint inhibitors in non-small-cell lung cancer*. *Eur J Cancer*, 2019. **106**: p. 144-159.
  59. Kos, F.T., et al., *Assessment of Prognostic Value of "Neutrophil to Lymphocyte Ratio" and "Prognostic Nutritional Index" as a Systemic Inflammatory Marker in Non-small Cell Lung Cancer*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2015. **16**(9): p. 3997-4002.
  60. Shaul, M.E. and Z.G. Fridlender, *Tumour-associated neutrophils in patients with cancer*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019. **16**(10): p. 601-620.
  61. Peterson, J.E., et al., *VEGF, PF4 and PDGF are elevated in platelets of colorectal cancer patients*. *Angiogenesis*, 2012. **15**(2): p. 265-73.
  62. Ding, N., et al., *The Prognostic Value of PLR in Lung Cancer, a Meta-analysis Based on Results from a Large Consecutive Cohort*. *Scientific Reports*, 2016. **6**(1): p. 34823.
  63. Yilmaz, U., et al., *The prognostic role of neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio in patients with stage III non-small cell lung cancer treated with concurrent chemoradiotherapy*. *Indian J Cancer*, 2018. **55**(3): p. 276-281.
  64. Diem, S., et al., *Neutrophil-to-Lymphocyte ratio (NLR) and Platelet-to-Lymphocyte ratio (PLR) as prognostic markers in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) treated with nivolumab*. *Lung Cancer*, 2017. **111**: p. 176-181.
  65. Dal Bello, M.G., et al., *The role of CEA, CYFRA21-1 and NSE in monitoring tumor response to Nivolumab in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients*. *Journal of Translational Medicine*, 2019. **17**(1).
  66. Jong, C., et al., *Association between serum biomarkers CEA and LDH and response in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy*. *Thoracic Cancer*, 2020. **11**(7): p. 1790-1800.
  67. Bocanegra, A., et al., *PD-L1 Expression in Systemic Immune Cell Populations as a Potential Predictive Biomarker of Responses to PD-L1/PD-1 Blockade Therapy in Lung Cancer*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019. **20**(7): p. 1631.
  68. Zheng, H., et al., *Expression of PD-1 on CD4+ T cells in peripheral blood associates with poor clinical outcome in non-small cell lung cancer*. *Oncotarget*, 2016. **7**(35): p. 56233-56240.

## X. ANEXO

**Tabla A 1. Panel de tinción de inmunofluorescencia extracelular para la inmunofenotipificación por citometría de flujo**

Laser	Filtro	Fluorescencia			Tubo 1	Tubo 2		Tubo 3				Tubo 4				Control 2		Control 3				Control 4							
		Emisión	Canal	Fluorocromo		Emisión	Blanco	T	B	Th1	Th17	Th2	Treg	Neutros	DC	Monos	NK	T	B	Th1	Th17	Th2	Treg	Neutros	DC	Monos	NK		
Violeta 405nm	440/50	VL1	Brilliant Violet 421™	423	Zombie Violet																								
	512/25	VL2	Brilliant Violet 510™	510		CD3		CD3				CD3				CD3		CD3				CD3							
	603/48	VL3	Brilliant Violet 605™	605		HLA-DR	IgD	HLA-DR				HLA-DR		CD16		HLA-DR	IgD	HLA-DR				HLA-DR	CD16						
	710/50	VL4	Brilliant Violet 711™	711		PD-L1		PD-L1				PD-L1																	
Azul 488nm	488/10	FSC																											
	488/10	SSC																											
	530/30	BL1	FITC	520			CD19	CD19					CD19	CD19					CD19	CD19									
	574/26	BL2	PE	578		CCR7	CD24	IFN-R	IL-6R	IL-4R	CD25	CD11c		CD56	CCR7	CD24	IFN-R	IL-6R	IL-4R	CD25	CD11c		CD56						
	695/40	BL3	PerCP-Cy5.5	695		CD4	CD4				CD4				CD4		CD4												
Rojo 637 nm	780/60	BL4	PE-Cy7	785		CD45RA	CD27	CCR6		CD127	CD14				CD45RA	CD27	CCR6		CD27	CD14									
	660/20	RL1	APC	660		CD38		IL-2R	CCR4		CD66b	CD123	CD66b	CD161	CD38		IL-2R	CCR4		CD66b	CD123	CD66b	CD161						
	720/30	RL2	Alexa Fluor® 700	719		PD-1		PD-1				PD-1																	
	780/60	RL3	APC/Cy7	785		CD8	CD20	CXCR3		CD45RO	CD20				CD8	CD20	CXCR3		CD45RO	CD20									

Tabla A 2. Comparación de los valores de citometría de flujo entre grupos

Variable	Total N=12	Total			Total			Pembrolizumab + DTX			DTX			Total			Pembrolizumab + DTX			DTX		
		Pembrolizumab + DTX n=6	DTX n=6	P	NR n=7	R n=6	P	NR n=3	R n=3	P	NR n=4	R n=2	P	SLP corta n=6	SLP Larga n=6	P	SLP corta n=4	SLP Larga n=2	P	SLP corta n=4	SLP Larga n=2	P
<b>Linfocitos (%)</b>																						
1T	36.825(18.2-54.1)	40.5(18.2-52.15)	33.35(22.65-54.1)	0.749	37.75(18.2-54.1)	30.8(19.8-46.55)	0.570	42.05(18.2-52.15)	38.95(19.8-46.55)	0.827	NE	NE	NE	40.5(22.65-54.1)	23.075(18.2-30.8)	<b>0.017</b>	NE	NE	NE	NE	NE	NE
2T	35.25(19.7-52.8)	37.35(23.7-46.2)	33.35(19.7-52.8)	0.423	35.5(23.7-52.8)	35(19.7-45)	0.685	35.95(23.7-46.2)	38.75(29.55-45)	0.827	NE	NE	NE	37.35(25.45-52.8)	26.625(19.7-35)	<b>0.027</b>	NE	NE	NE	NE	NE	NE
<b>Linfocitos T<sub>H1</sub> (%)</b>																						
1T	0.033(0-1.21)	0.278(0-0.96)	0(0-1.21)	0.393	0.066(0-1.21)	0(0-0.52)	0.603	0.066(0-0.96)	0.49(0-0.52)	1.000	NE	NE	NE	0.295(0-1.21)	0(0-0)	<b>0.030</b>	NE	NE	NE	NE	NE	NE
2T	0.47(0-1.42)	0.22(0-0.6)	0.75(0-1.42)	0.245	0.5(0-1.42)	0.44(0-1.2)	0.801	0(0-0.6)	0.44(0-0.54)	0.817	NE	NE	NE	0.52(0-1.42)	0(0-1.2)	0.291	NE	NE	NE	NE	NE	NE
<b>Linfocitos T<sub>H1</sub> inactivos PD-1+ (%)</b>																						
1T	0.325(0-3.74)	0.23(0-2.33)	1.49(0-3.74)	0.328	1.64(0-3.74)	0(0-1.34)	0.098	0.28(0.18-2.33)	0(0-0.37)	0.268	NE	NE	NE	0.325(0-3.74)	0.67(0-2.33)	0.604	NE	NE	NE	NE	NE	NE
2T	0.375(0-33.3)	0.29(0-0.68)	0.306(0-33.3)	0.192	1.15(0-33.3)	0(0-0.39)	<b>0.032</b>	0.36(0-0.68)	0(0-0.39)	0.658	NE	NE	NE	0.915(0-33.3)	0(0-0.36)	<b>0.031</b>	NE	NE	NE	NE	NE	NE
<b>Linfocitos T<sub>H17</sub> PD-1+ (%)</b>																						
1T	0.67(0-3.75)	0.405(0-2.22)	2.305(0-3.75)	0.333	1.69(0-3.75)	0.47(0-2.92)	0.368	0.34(0.17-2.22)	0.47(0-0.87)	0.827	NE	NE	NE	0.405(0-3.75)	1.545(0-2.92)	0.732	NE	NE	NE	NE	NE	NE
2T	0.54(0-33.3)	0.335(0-0.93)	2.545(0-33.3)	0.192	1.06(0-33.3)	0(0-0.46)	<b>0.021</b>	0.62(0-0.93)	0.21(0-0.46)	0.376	NE	NE	NE	0.995(0-33.3)	0(0-0.62)	<b>0.047</b>	NE	NE	NE	NE	NE	NE
<b>Linfocitos T<sub>H</sub> PD-1+ (%)</b>																						
1T	0.66(0-4.24)	0.445(0.16-2.22)	2.355(0-4.24)	0.423	1.79(0-4.24)	0.49(0-2.92)	0.515	0.4(0.16-2.22)	0.49(0.26-0.83)	0.827	NE	NE	NE	0.445(0-4.24)	1.525(0-2.92)	0.799	NE	NE	NE	NE	NE	NE
2T	0.475(0-33.3)	0.29(0-0.92)	2.805(0-33.3)	0.192	1(0-33.3)	0(0-0.33)	<b>0.021</b>	0.62(0-0.92)	0.25(0-0.33)	0.376	NE	NE	NE	0.96(0-33.3)	0(0-0.62)	<b>0.047</b>	NE	NE	NE	NE	NE	NE
<b>DN PD-1+ (%)</b>																						
1T	0.54(0-3.85)	0.315(0-0.62)	1.31(0-3.85)	<b>0.045</b>	0.62(0-3.85)	0.36(0-1.65)	0.515	0.46(0.27-0.62)	0.11(0-0.36)	0.127	NE	NE	NE	0.54(0-3.85)	0.62(0-1.65)	0.799	NE	NE	NE	NE	NE	NE
2T	0.835(0-11.4)	0.335(0.17-1.75)	1.58(0-11.4)	0.109	1.75(0-11.4)	0.59(0.29-1.16)	0.685	0.2(0.17-1.75)	0.38(0.29-0.59)	0.513	NE	NE	NE	1.17(0-11.4)	0.73(0.2-1.16)	0.610	NE	NE	NE	NE	NE	NE
<b>CTL efectores activos (%)</b>																						
1T	1.165(0-18.8)	2.615(0-5.06)	0(0-18.8)	0.732	2.92(0-18.8)	0(0-2.9)	0.225	2.92(0-5.06)	2.32(0-2.9)	0.376	NE	NE	NE	2.91(0-18.8)	0(0-0)	<b>0.030</b>	NE	NE	NE	NE	NE	NE
2T	0.995(0-24.8)	5.57(0-24.8)	0(0-10)	0.171	1.99(0-17.4)	0(0-24.8)	0.729	6.88(0-17.4)	4.26(0-24.8)	1.000	NE	NE	NE	5.57(0-24.8)	0(0-0)	<b>0.030</b>	NE	NE	NE	NE	NE	NE
<b>CTL<sub>cm</sub> (%)</b>																						
1T	0(0-8.33)	0(0-0.32)	0.34(0-8.33)	0.284	0.32(0-8.33)	0(0-0)	<b>0.024</b>	0.18(0-0.32)	0(0-0)	0.121	NE	NE	NE	0.25(0-8.33)	0(0-0)	0.058	NE	NE	NE	NE	NE	NE
2T	0(0-1.56)	0(0-0)	0(0-1.56)	0.140	0(0-1.56)	0(0-0)	0.140	0(0-0)	0(0-0)	1.000	NE	NE	NE	0(0-1.56)	0(0-0)	0.296	NE	NE	NE	NE	NE	NE
<b>CTL PD-1+ (%)</b>																						
1T	3.63(0-27.7)	2(0-5.95)	9.31(0-27.7)	0.092	4.82(1.8-27.7)	2.1(0-5.95)	0.167	1.9(1.8-3.51)	2.1(0-5.95)	0.827	NE	NE	NE	5.385(1.8-27.7)	1.755(0-3.75)	0.089	NE	NE	NE	NE	NE	NE
2T	3.865(0.68-22.7)	2.065(0.68-11.5)	17.1(1.56-22.7)	<b>0.007</b>	11.5(1.27-22.7)	2.85(0.68-14.3)	0.465	1.75(1.27-11.5)	2.38(0.68-2.85)	0.827	NE	NE	NE	7.175(0.68-22.7)	3.63(1.27-14.3)	0.610	NE	NE	NE	NE	NE	NE
<b>Linfocitos T PD-1+ (%)</b>																						
1T	1.105(0.41-7.64)	0.72(0.41-0.96)	2.625(1.25-7.64)	<b>0.034</b>	1.25(0.67-7.64)	0.86(0.41-2.47)	0.223	0.77(0.67-0.96)	0.61(0.41-0.86)	0.275	NE	NE	NE	1.055(0.61-7.64)	1.3(0.41-2.47)	0.734	NE	NE	NE	NE	NE	NE
2T	1.315(0.4-23.4)	0.615(0.4-3.27)	2.885(1.29-23.4)	<b>0.016</b>	3.27(0.4-23.4)	0.74(0.54-1.54)	0.291	0.61(0.4-3.27)	0.62(0.54-0.74)	0.827	NE	NE	NE	2.28(0.4-23.4)	0.98(0.61-1.54)	0.497	NE	NE	NE	NE	NE	NE
<b>Linfocitos T PD-1+ (MFI)</b>																						
1T	645.5(561-2413)	634(561-656)	690.5(639-2413)	<b>0.037</b>	656(599-2413)	643(561-710)	0.570	626(599-656)	642(561-648)	0.827	NE	NE	NE	649(561-2413)	645.5(599-710)	0.865	NE	NE	NE	NE	NE	NE
2T	665(556-1300)	669.5(592-1300)	657(556-822)	0.522	646(556-677)	761(647-1300)	<b>0.019</b>	662(592-677)	761(647-1300)	0.275	NE	NE	NE	646.5(556-761)	762.5(662-1300)	<b>0.042</b>	NE	NE	NE	NE	NE	NE
<b>MBC (%)</b>																						
1T	5.405(1.22-41.2)	9.91(1.9-22.8)	5.405(1.22-41.2)	0.873	5.27(1.98-41.2)	5.54(1.22-22.8)	0.685	4.12(1.98-19.7)	15.7(1.9-22.8)	0.827	NE	NE	NE	15.55(3.26-41.2)	1.94(1.22-5.54)	<b>0.027</b>	NE	NE	NE	NE	NE	NE
2T	13.35(4.99-42.3)	12.15(4.99-17.7)	15.5(6.97-42.3)	0.423	13.6(4.99-42.3)	13.1(6.97-17.4)	0.685	8.6(4.99-17.7)	13.1(11.2-14.6)	0.513	NE	NE	NE	14.1(7.49-42.3)	9.085(4.99-17.4)	0.126	NE	NE	NE	NE	NE	NE
<b>MBC activos PD-L1+ (%)</b>																						
1T	1.28(0-5.56)	2.575(0.27-5.56)	0(0-1.42)	<b>0.009</b>	1.42(0-5.56)	0.27(0-3.62)	0.563	3.06(2.09-5.56)	1.89(0.27-3.62)	0.275	NE	NE	NE	1.28(0-3.62)	0.945(0-5.56)	0.863	NE	NE	NE	NE	NE	NE
2T	0.805(0-5.88)	2.13(0-5.88)	0(0-2.47)	0.171	1.61(0-5.88)	0(0-3.19)	0.862	1.61(0-5.88)	2.65(0-3.19)	1.000	NE	NE	NE	2.17(0-5.88)	0(0-0)	<b>0.030</b>	NE	NE	NE	NE	NE	NE
<b>MBC PD-L1+ (%)</b>																						
1T	10.2(1.76-46.6)	4.52(1.76-12.5)	16.85(4.65-46.6)	<b>0.037</b>	8.24(2.7-46.6)	12.5(1.76-17.5)	0.685	4.77(4.27-12.2)	3.49(1.76-12.5)	0.513	NE	NE	NE	4.71(1.76-46.6)	14.35(12.2-17.5)	0.174	NE	NE	NE	NE	NE	NE
2T	7.355(1.77-49.4)	2.765(1.77-13.1)	23.15(2.14-49.4)	0.078	13.1(2.14-49.4)	3.31(1.77-12.1)	0.291	3.13(2.31-13.1)	2.4(1.77-3.31)	0.513	NE	NE	NE	8.205(2.14-49.4)	6.855(1.77-12.1)	0.234	NE	NE	NE	NE	NE	NE
<b>MBC PD-L1+ (MFI)</b>																						
1T	0.88(0-3.09)	1.15(0.47-1.67)	0.63(0-3.09)	0.262	1.02(0-1.51)	0.74(0.47-3.09)	0.465	1.28(1.02-1.51)	0.74(0.47-1.67)	0.513	NE	NE	NE	0.91(0-1.67)	0.88(0.68-3.09)	0.497	NE	NE	NE	NE	NE	NE
2T	1.35(0.09-2.47)	1.985(0.11-2.47)	1.02(0.09-1.55)	0.109	1.45(0.09-2.14)	0.79(0.1-2.47)	0.808	2.03(0.46-2.14)	1.94(0.11-2.47)	0.827	NE	NE	NE	1.745(0.09-2.47)	0.285(0.1-0.79)	<b>0.042</b>	NE	NE	NE	NE	NE	NE
<b>MBC PD-L1+ (MFI)</b>																						
1T	253(204-338)	257.5(236-338)	228.5(204-263)	0.078	262(222-338)	236(204-253)	0.088	293(262-338)	253(236-253)	<b>0.046</b>	NE	NE	NE	254.5(222-338)	238.5(204-293)	0.444	NE	NE	NE	NE	NE	NE
2T	253(204-338)	257.5(236-338)	228.5(204-263)	0.078	262(222-338)	236(204-253)	0.088	293(262-338)	253(236-253)	<b>0.046</b>	NE	NE	NE	254.5(222-338)	238.5(204-293)	0.444	NE	NE	NE	NE	NE	NE
<b>Células plasmáticas (%)</b>																						
1T	40.75(16.6-51.3)	39.35(27.3-46.7)	40.75(16.6-51.3)	0.873	40.5(16.6-51.2)	41(27.3-51.3)	0.808	45.2(33.5-46.7)	32.2(27.3-46.5)	0.275	NE	NE	NE	32.85(16.6-51.2)	46.6(41-51.3)	<b>0.042</b>	NE	NE	NE	NE	NE	NE
2T																						