

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



TESI DOCTORAL

Búsqueda de factores predictivos de respuesta a
inmunoterapia

Autora:
Geòrgia Anguera Palacios

Directoras:
Dra. Margarita Majem Tarruella
Dra. Silvia Vidal Alcorisa

Tutora:
Dra. Ariadna Tibau Martorell

Programa de Doctorat en Medicina
Departament de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona
Barcelona, 2025

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiese sido posible sin la colaboración desinteresada de muchas personas que han puesto su tiempo, sus conocimientos y su apoyo a mi disposición.

En primer lugar, me gustaría mostrar mi agradecimiento a mis directoras de tesis. A la Dra. Majem por su empuje durante todo este tiempo, sus conocimientos y sus ganas, sin ello, este proyecto no hubiera podido completarse. Y a la Dra. Vidal por introducirme en el mundo del laboratorio, por despertar en mí este interés por la investigación y por todo lo que me han enseñado a lo largo de estos años.

A la Dra. Ariadna Tibau, por aceptar ser la tutora de esta tesis, por todas las enseñanzas durante mi residencia y la confianza puesta en mí.

Gracias a todos mis compañeros de Oncología Médica. En especial a Anna Virgili, que ha sido la perfecta compañera durante este “viaje”, sin ella nada de esto hubiera sido posible. También a Ivana Sullivan, Andrés Barba y Sergio Martínez por contribuir de forma activa en los proyectos y ayudarme durante este tiempo.

Gracias a los compañeros del laboratorio de Inmunología, en especial a Carlos Zamora y a Maria Mulet por su ayuda y sus enseñanzas.

De forma especial a mi madre y a mis abuelos, por su apoyo, sus enseñanzas, por sentar las bases que han hecho que sea quien soy hoy, por ayudarme crecer en todos los aspectos.

A Carlos y a mis tres hijos, Aday, Emma y Dara, por ser mi soporte, mi razón de ser y por su incondicional apoyo y paciencia.

Finalmente, gracias a los pacientes por participar desinteresadamente en la investigación.

A mi Madre,

A Carlos, Aday, Emma y Dara

ABREVIATURAS

18F-FDG	Fluor-18-fluorodesoxiglucosa
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico Circulante
AJCC	Del inglés, <i>American Joint Committee on Cancer</i>
AKT	Del inglés, <i>Protein Kinase B</i>
ALK	Del inglés, <i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
ARID1A	Del inglés, <i>AT-rich Interaction Domain 1A</i>
ARN	Ácido Ribonucleico
AUC	Del inglés, <i>Area Under the Curve</i>
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BRAF	Del inglés, <i>B-RAF Proto-oncogene Serine/Threonine Kinase</i>
BSC	Del inglés, <i>Best Supportive Care</i>
bTMB	Del inglés, <i>Blood Tumor Mutational Burden</i>
CBDCA	Carboplatino
CK	Del inglés, <i>Cytokeratin</i>
CPCNP	Cáncer de Pulmón de Célula No Pequeña
CTCAE	Del inglés, <i>Common Terminology Criteria for Adverse Events</i>
CTLA-4	Del inglés, <i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4</i>
CTs	Células Tumorales
dNLR	Del inglés, <i>Derived Neutrophil-Lymphocyte Ratio</i>
EBUS	Del inglés, <i>Endobronchial Ultrasound</i>
ECOG	Del inglés, <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EE	Enfermedad Estable
EE.UU.	Estados Unidos de América

EGFR	Del inglés, <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ESMO	Del inglés, <i>European Society of Medical Oncology</i>
EUS	Del inglés, <i>Endoscopic Ultrasound</i>
FISH	Del inglés, <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
HER2	Del inglés, <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HR	Del inglés, <i>Hazard Ratio</i>
IC	Intervalo de Confianza
ICI	Del inglés, <i>Immune-Checkpoint Inhibitors</i>
IFN	Interferón
IHC	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
IPD	Del inglés, <i>Integrated PD-L1 Data</i>
irAEs	Del inglés, <i>Immune-Related Adverse Events</i>
KEAP1	Del inglés, <i>Kelch-like ECH-Associated Protein 1</i>
KRAS	Del inglés, <i>V-Ki-RAS2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
LDH	Lactato Deshidrogenasa
LIPI	Del inglés, <i>Lung Immune Prognostic Index</i>
MAP2K1	Del inglés, <i>Mitogen-Activated Protein Kinase 1</i>
MET	Del inglés, <i>Mesenchymal and Epithelial Transition</i>
MHC	Del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMRD	Del inglés, <i>Mismatch Repair Deficiency</i>
MSI	Del inglés, <i>Microsatellite Instability</i>
mTOR	Del inglés, <i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NA	No Alcanzada
NGS	Del inglés, <i>Next-Generation Sequencing</i>

NK	Del inglés, <i>Natural Killers</i>
NLR	Del inglés, <i>Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio</i>
NRAS	Del inglés, <i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
NRF2	Del inglés, <i>Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2</i>
NTRK	<i>Del inglés, Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
p40	Del inglés, <i>Protein 40</i>
p60	Del inglés, <i>Protein 60</i>
PAAF	Punción Aspiración con Aguja Fina
PD-1	Del inglés, <i>Programmed Death-1</i>
PD-L1	Del inglés, <i>Programmed Death-Ligand 1</i>
PE	Progresión de la Enfermedad
PET	Del inglés, <i>Positron Emission Tomography</i>
PI3K	Del inglés, <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
PLTs	Plaquetas
PMPs	Del inglés, <i>Platelet Microparticles</i>
POLE	Del inglés, <i>DNA Polymerase Epsilon</i>
PS	Del inglés, <i>Performance Status</i>
PTEN	Del inglés, <i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
QT	Quimioterapia
R	Pacientes Respondedores
RB1	Retinoblastoma 1
RC	Respuesta Completa
RCp	Respuesta Completa Patológica
RECIST	Del inglés, <i>Response Evaluation Criteria in Solid Tumors</i>
REDECAN	Red Española de Registros del Cáncer

RET	Del inglés, <i>Rearranged During Transfection</i>
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROC	Del inglés, <i>Receiver Operating Characteristic</i>
ROS1	Del inglés, <i>ROS Proto-Oncogene 1 Receptor Tyrosine-Kinase</i>
RP	Respuesta Parcial
RR	Riesgo Relativo
RT	Radioterapia
SABR	Del inglés, <i>Stereotactic Ablative Radiotherapy</i>
SBRT	Del inglés, <i>Stereotactic Body Radiotherapy</i>
SG	Supervivencia Global
SIADH	Síndrome de Secreción Inadecuada de Hormona Antidiurética
SLE	Supervivencia Libre de Enfermedad
SLEv	Supervivencia Libre de Evento
SLP	Supervivencia Libre de Progresión
SMARCA4	Del inglés, <i>SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator of Chromatin, Subfamily A, Member 4</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
sPD-L1	Del inglés, <i>Soluble Programmed Death-Ligand 1</i>
STK11	Del inglés, <i>Serine/Threonine Kinase 11</i>
TC	Tomografía Axial Computerizada
TCR	Del inglés, <i>T Cell Receptor</i>
TKI	Del inglés, <i>Tyrosine Kinase Inhibitors</i>
TMB	Del inglés, <i>Tumor Mutational Burden</i>
TME	Del inglés, <i>Tumor Microenvironment</i>

TNF-alfa	Del inglés, <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
TNM	Del inglés, <i>Tumor, Node, Metastasis</i>
TP53	Del inglés, <i>Tumor Protein 53</i>
TPS	Del inglés, <i>Tumor Proportion Score</i>
TRO	Tasa de Respuesta Objetiva
TSH	Del inglés, <i>Thyroid-Stimulating Hormone</i>
TTF1	Del inglés, <i>Thyroid Transcription Factor-1</i>
UICC	Unión Internacional Contra el Cáncer
VAMLA	Del inglés, <i>Video-Assisted Mediastinal Lymphadenectomy</i>
VATS	Del inglés, <i>Video-Assisted Thoracoscopic Surgery</i>
VHB	Virus de Hepatitis B
VHC	Virus de Hepatitis C
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 El cáncer de pulmón	13
1.1.1 Epidemiología	13
1.1.2 Factores de riesgo.....	14
1.1.3 Diagnóstico y estadificación.....	16
1.1.3.1 Diagnóstico	16
1.1.3.2 Estadificación	20
1.1.4 Clasificación histopatológica, inmunohistoquímica y molecular	24
1.1.4.1 Caracterización Molecular del CPCNP.....	25
1.1.4.2 Expresión de PD-L1	27
1.1.5 Factores pronósticos.....	27
1.1.6 Tratamiento del CPCNP.....	28
1.1.6.1 Enfermedad localizada. (Estadios I-II) y localmente avanzada potencialmente resecables (hasta IIIA-N2)	28
1.1.6.2 Enfermedad localmente avanzada irresecable	31
1.1.6.3 Enfermedad avanzada. Estadio IV.....	31
1.1.6.3.1 <i>Pacientes con CPCNP sin alteraciones moleculares accionables</i>	31
1.1.6.3.2 <i>Pacientes con CPCNP con alteraciones moleculares</i>	32
1.2 Inmunoterapia	34
1.2.1 Bases de la inmunología y el cáncer	34
1.2.2 Puntos de control inmunológico y CPCNP	38
1.2.2.1 Tratamiento del CPCNP.....	38
1.2.2.1.1 <i>Enfermedad localizada. (Estadios I-II) y localmente avanzada potencialmente resecables (hasta IIIA-N2)</i>	38
1.2.2.1.2 <i>Enfermedad localmente avanzada irresecable</i>	40
1.2.2.1.3 <i>Enfermedad avanzada. Estadio IV</i>	41
1.2.2.2 Factores predictivos de eficacia en el tratamiento con anti-PD-(L)1 ..	47
1.2.2.2.1 <i>Biomarcadores propios del tumor</i>	47
1.2.2.2.2 <i>Factores propios del huésped</i>	52
2. HIPOTESIS.....	57
3. OBJETIVOS.....	61
3.1 Objetivo Principal.....	63
3.2 Objetivos Secundarios.....	63
4. COMPENDIO DE PUBLICACIONES	65

4.1	La integración de PD-L1 sistémico y tumoral como biomarcador predictivo de los resultados clínicos en pacientes con CPCNP avanzado tratados con inhibidores de PD-(L)1.	67
4.2	Análisis del papel potencial de los leucocitos-PD-L1+ circulantes como factor predictor de respuesta al tratamiento con inhibidores del PD-(L) 1 en CPCNP	83
5.	RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS.....	103
6.	RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN	113
7.	CONCLUSIONES.....	119
8.	LINEAS DE FUTURO	123
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	127

RESUMEN

Los inhibidores de los puntos de control inmunológicos (o ICI, del inglés, *Immune-Checkpoint Inhibitors*) han revolucionado el escenario del tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), siendo en la actualidad, el tratamiento de elección en enfermedad localizada o avanzada ya sea en monoterapia o en combinación.

En pacientes con CPCNP el bloqueo de PD-1 o PD-L1 ofrece beneficios en la tasa de control de la enfermedad y la supervivencia. Sin embargo, una proporción de los pacientes tratados no experimenta ningún beneficio, por ello es importante el desarrollo de biomarcadores que identifiquen aquellos pacientes que obtendrán beneficio.

La expresión tumoral de PD-L1 es, actualmente, el único biomarcador predictivo aprobado en el tratamiento del CPCNP con anti-PD-(L)1. Muchos estudios han demostrado una correlación positiva entre su expresión y la eficacia de la inmunoterapia. Sin embargo, la expresión tumoral de PD-L1 no siempre se correlaciona con la eficacia, ya que existen pacientes con alta expresión que no obtienen beneficio y, por el contrario, pacientes sin expresión tumoral de PD-L1 responden a estos tratamientos. Hay evidencia de que, a parte de la expresión de PD-L1 tumoral, hay otras fuentes de PD-L1 como por ejemplo, la que se asocia a células leucocitarias circulantes y a plaquetas.

El objetivo principal de esta tesis es analizar el papel de las diferentes fuentes de expresión de PD-L1, tanto en el tumor como en circulantes en la forma de molécula plasmática soluble (sPD-L1) o expresada en la superficie de leucocitos circulantes, plaquetas (PLTs) o PMPs (del inglés, *Platelet Microparticles*), como potenciales biomarcadores de eficacia del tratamiento con anti-PD-(L)1 en pacientes con CPCNP avanzado. Como objetivo secundario, evaluar a nivel basal la expresión de PD-L1 con la supervivencia global, supervivencia libre de progresión y respuesta al tratamiento con anti-PD-(L)1 en pacientes con CPCNP avanzado. También evaluar los cambios en la expresión de PD-L1 de población leucocitaria y PLTs (Plaquetas), y la asociación de cambios en la concentración de los inmunomoduladores solubles en plasma (citocinas) durante el tratamiento con anti-PD-(L)1 en pacientes con CPCNP avanzado y su relación con la respuesta radiológica.

En el trabajo se demostró que, en los pacientes con CPCNP avanzado, los porcentajes de las subpoblaciones circulantes de leucocitos, PLTs y PMPs con expresión de PD-L1 así como los niveles plasmáticos (sPD-L1), eran independientes de la expresión de PD-L1 en el tumor.

Además, en comparación con los donantes sanos, en los pacientes con CPCNP se detectó que las subpoblaciones de leucocitos circulantes + (linfocitos T CD4+ y CD8+, células NK, monocitos y neutrófilos), PLTs y PMPs presentaban mayor expresión de PD-L1, así como también niveles más altos de sPD-L1 en plasma.

Se demostró los pacientes con porcentajes más altos de monocitos, neutrófilos, PLTs y PMPs PD-L1+ obtuvieron una supervivencia libre de progresión (SLP) mayor. Además, los pacientes con un porcentaje alto de monocitos PD-L1+ y una expresión tumoral de PD-L1 alta tuvieron una mediana de supervivencia global (SG) mayor. Sin embargo en el análisis multivariado solo los porcentajes altos de monocitos y PMPs PD-L1+ fueron variables independientes para predecir la SLP y los porcentajes altos de monocitos PD-L1+ y la expresión tumoral alta de PD-L1 fueron variables independientes para predecir la SG.

Se realizó una integración de los datos de PD-L1 circulante y tumoral para predecir los resultados clínicos en pacientes que recibieron anti-PD-(L)1, que se denominó IPD (del inglés, *Integrated PD-L1 data*) y a través de una curva ROC, comparando pacientes con progresión de la enfermedad (PE) frente a los pacientes sin PE tras el tratamiento con inhibidores de PD-(L)1, se generó un punto de corte. Los pacientes con IPD superior al punto de corte tenían una mediana de SLP y de SG significativamente superior que aquellos con IPD inferior.

Además, en los estudios centrados en la dinámica de los biomarcadores en sangre a lo largo del tratamiento, se demostró que una disminución significativa en los porcentajes de monocitos y neutrófilos PD-L1+ después de las primeras 4-6 semanas de tratamiento con anti-PD(L)1 se asoció con mejores tasas de respuesta radiológica. Y tras 10-12 semanas de tratamiento, las concentraciones plasmáticas de IL-17 aumentaron en los pacientes con respuesta radiológica.

Por tanto, el enfoque integral de las fuentes de expresión de PD-L1 tumoral y las circulantes permitiría identificar mejor a aquellos pacientes que presentaran mayor beneficio de los agentes bloqueadores de PD-(L)1, de manera que esto ayude a la toma de decisiones terapéuticas.

ABSTRACT

Immune checkpoint inhibitors (ICIs) have transformed the treatment landscape for non-small cell lung cancer (NSCLC), currently used as the treatment of choice for localized or advanced disease, either as monotherapy or in combination. In patients with advanced NSCLC, the blockade of PD-1 or PD-L1 has demonstrated a higher disease control rate and survival benefit. However, a proportion of treated patients do not experience any benefit, which highlights the need to develop reliable biomarkers.

Tumor expression of PD-L1 is the only approved predictive biomarker for patients diagnosed with NSCLC and treated with PD-(L)1 inhibitors. Numerous studies have shown a positive correlation between its expression and the effectiveness of ICIs. However, tumor PD-L1 expression does not always correlate with efficacy, as there are patients with high PD-L1 expression who do not benefit, and conversely, patients without tumor PD-L1 expression who respond to these treatments. Evidence suggests that aside from tumor PD-L1 expression, there may be other PD-L1 sources, (such as that associated with circulating leukocytes and platelets) that also play a role.

The primary objective of this thesis is to analyze the role of different PD-L1 expression sources, both within the tumor and circulating. The soluble sources analysed as potential biomarkers of treatment efficacy with anti-PD-(L)1 in patients with advanced NSCLC were: soluble PD-L1 (sPD-L1) and circulating leukocytes, platelets (PLTs), or platelet microparticles (PMPs) with PD-L1 expression. The secondary objective was to evaluate baseline PD-L1 expression in relation to overall survival, progression-free survival, and response to anti-PD-(L)1 therapy in advanced NSCLC patients. Additionally, during anti-PD-(L)1 treatment in advanced NSCLC patients the changes in PD-L1 expression in leukocyte and PLT populations and plasma-soluble immunomodulator (cytokine) concentrations were evaluated and its association with the radiological response. Additionally, changes in PD-L1 expression within leukocyte and platelet populations, as well as cytokine concentrations, were evaluated during anti-PD-(L)1 treatment in advanced NSCLC patients, along with their association with radiological response."

This study demonstrated that in patients with advanced NSCLC, the percentages of circulating leukocyte, PLT, and PMPs subpopulations expressing PD-L1, as well as plasma levels (sPD-L1), were independent of tumor PD-L1 expression. Moreover,

compared to healthy donors, NSCLC patients showed higher PD-L1 expression in circulating leukocyte subpopulations (CD4+ and CD8+ T lymphocytes, NK cells, monocytes, and neutrophils), PLTs, and PMPs, as well as higher plasma sPD-L1 levels.

Patients with higher percentages of PD-L1+ monocytes, neutrophils, PLTs, and PMPs had longer median progression-free survival (PFS). Additionally, patients with a high percentage of PD-L1+ monocytes and high tumor PD-L1 expression had a longer median overall survival (OS). However, in multivariate analysis, only high percentages of PD-L1+ monocytes and PMPs were independent variables predictive of PFS, while high PD-L1+ monocyte percentages and high tumor PD-L1 expression were independent variables predictive of OS.

An integration of circulating and tumor PD-L1 data was conducted to predict clinical outcomes in patients who received anti-PD-(L)1, named "Integrated PD-L1 data" (IPD). Using a ROC curve, a cutoff point was generated by comparing patients with disease progression (DP) versus those without DP after treatment with PD-(L)1 inhibitors. Patients with IPD above the cutoff had significantly longer median PFS and OS compared to those with IPD below the cutoff.

Additionally, studies on the dynamics of blood biomarkers during treatment showed that a significant reduction in the percentages of PD-L1+ monocytes and neutrophils after the first 4-6 weeks of anti-PD-(L)1 treatment was associated with better radiological response rates. Also, after 10-12 weeks of anti-PD-(L)1 treatment, plasma IL-17 concentration increase in those patients with radiological response.

Thus, an integrated approach to assessing both tumor and circulating PD-L1 expression sources could better identify patients who would derive greater benefit from PD-(L)1 blocking agents.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El cáncer de pulmón

1.1.1 Epidemiología

Actualmente el cáncer es uno de los grupos de enfermedades de mayor impacto a nivel social, económico y de salud pública.

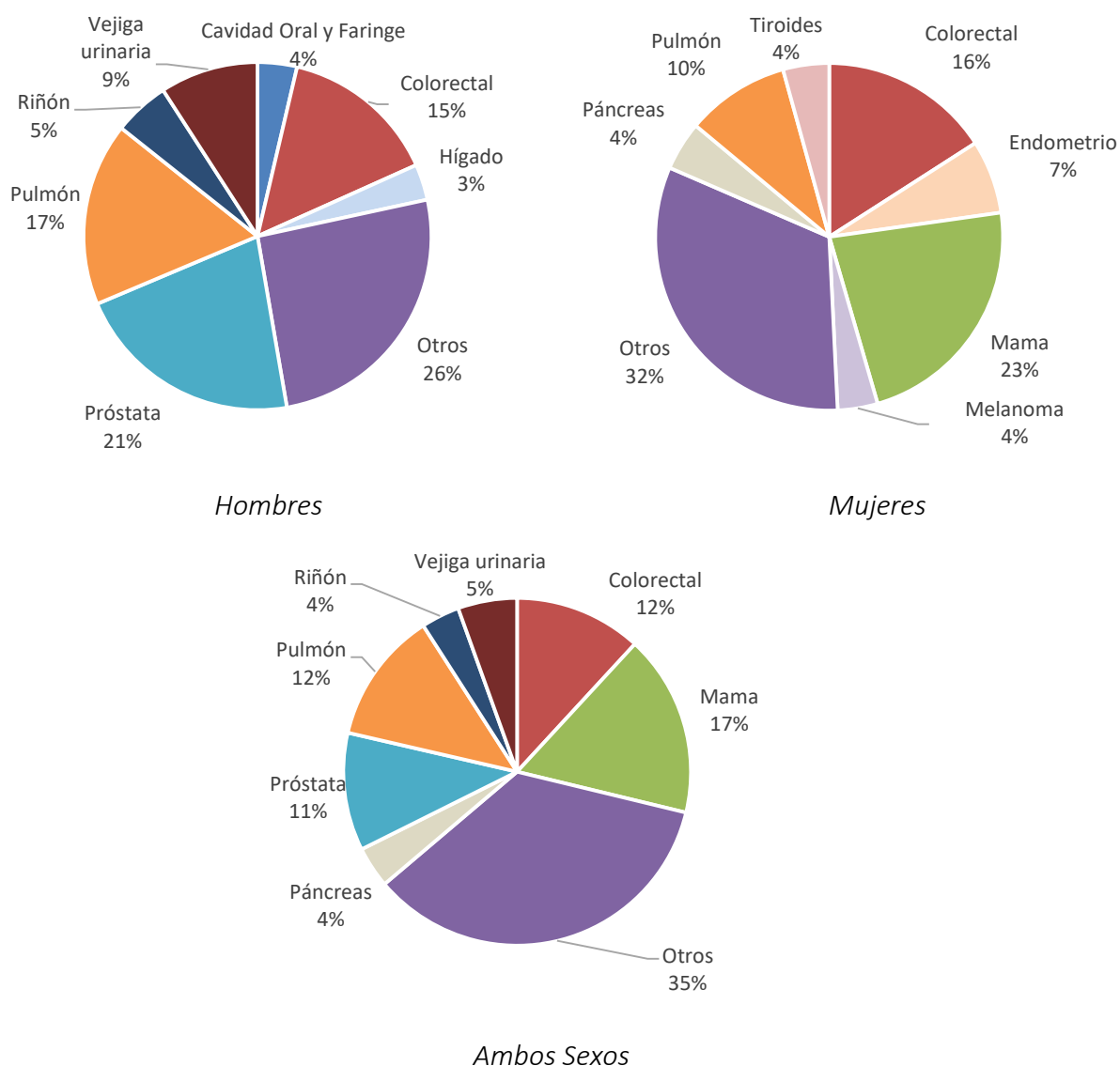
En 2022, se estimaron 20 millones de nuevos casos en todo el mundo y 9,7 millones de muertes por cáncer¹. Aproximadamente uno de cada cinco hombres o mujeres desarrollará cáncer a lo largo de su vida, mientras que alrededor de uno de cada nueve hombres y una de cada doce mujeres morirán por esta causa¹.

A nivel mundial, en las mujeres, el cáncer de mama es el más frecuentemente diagnosticado y la principal causa de muerte por cáncer, seguido por el cáncer de pulmón¹. En los hombres, el cáncer de pulmón es el más frecuente (tanto en casos como en muertes), seguido por el cáncer de próstata¹. Sin embargo, para ambos sexos, a nivel mundial, el cáncer de pulmón es el cáncer más comúnmente diagnosticado (12,4% del total de casos; 2,5 millones de Nuevos casos) y también es la principal causa de muerte por cáncer (18,7% del total de muertes por cáncer o 1,8 millones de muertes)¹.

Según datos del instituto nacional de estadística, en el año 2023, el cáncer se situó como primera causa de muerte en 2023, con un 26,6% del total de defunciones, seguidos de las enfermedades del sistema circulatorio (26,5%). Entre todos los cánceres, el cáncer de pulmón fue la causa más frecuente (con 22.717 defunciones)².

En cuanto a la incidencia, las estimaciones según REDECAN (Red Española de Registros del Cáncer) para el 2024 el número total de casos incidentes de cáncer estimados para 2024 es de 286.664, de los que 161.678 son en hombres y 124.986 en mujeres. En el conjunto de la población española, el tumor más frecuente es el de colon y recto con un total de 44.294 nuevos casos (29.648 de colon y 14.646 de recto). Le siguen el cáncer de mama en la mujer con 36.395 nuevos casos, el cáncer de pulmón con 32.768 nuevos casos y el de próstata con 30.316 nuevos casos³.

Figura 1: Incidencia de los distintos tipos de Cáncer en España. Datos de REDECAN ³



1.1.2 Factores de riesgo

El cáncer de pulmón se ha asociado a múltiples factores ambientales y estilos de vida, destacando el tabaco como el principal factor de riesgo para su desarrollo. A continuación, se comentan los principales factores de riesgo.

Tabaco: Aproximadamente el 85% al 90% de los casos son causados por el consumo voluntario o involuntario de cigarrillos⁴. Se estima que el 81% de las muertes por cáncer de pulmón en 2024 serán causadas directamente por el consumo de cigarrillos. El humo del cigarrillo contiene múltiples productos químicos considerados carcinógenos. Destacan las nitrosaminas, los hidrocarburos aromáticos polinucleares, las aminas aromáticas, los bencenos, el arsénico y el acetaldehído⁵.

Radón: La exposición al radón es el segundo factor de riesgo más común en España para el cáncer de pulmón en fumadores y la primera causa en pacientes sin historia previa de tabaquismo^{6,7}. La OMS (Organización Mundial de la Salud) estima que el 3-15 % de todos los cánceres de pulmón están causados por la exposición a radón⁷.

Asbesto: El asbesto es un carcinógeno que aumenta el riesgo (RR=3,5) de cáncer de pulmón en personas expuestas a fibras en el aire. La exposición a fibras de asbesto es responsable del 3-4 % de los casos de cáncer de pulmón⁸.

Contaminación del aire exterior: La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer enumera varios agentes conocidos por causar cáncer de pulmón, incluyendo arsénico, asbestos, berilio, cadmio, cromo, humo de carbón, vapores de diésel, níquel, sílice, hollín y uranio⁴. En los países industrializados agentes contaminantes ambientales han sido estudiados como posibles causas de cáncer de pulmón por ejemplo, los hidrocarburos policíclicos relacionados con el uso de combustibles fósiles que se emiten en centrales eléctricas, industrias, tubos de escape de automoción, etc.

Factores dietéticos: El alto consumo de frutas y verduras frescas disminuye la incidencia de cáncer de pulmón entre fumadores, no fumadores o exfumadores para cualquier subtipo histológico⁹. Se ha descrito un aumento de riesgo de cáncer de pulmón en personas con dietas ricas en colesterol y grasas saturadas¹⁰.

Patología inflamatoria y benigna pulmonar: Está descrito un aumento del riesgo a desarrollar cáncer de pulmón en pacientes con patología benigna pulmonar e inflamación crónica, sobre todo en pacientes con antecedentes de enfermedad obstructiva pulmonar crónica y procesos infecciosos tipo neumonía y tuberculosis.

Factores genéticos: Estudios de agregación familiar respaldan la hipótesis de una herencia multifactorial algunos genes que se han relacionado con el riesgo de padecer cáncer de pulmón con el gen de la retinoblastoma (*RB1*) y el gen *TP53*. Ambos con un riesgo inferior al 0,1¹¹. Sin embargo, las bases moleculares de este riesgo familiar no están claramente identificadas ni definidas.

1.1.3 Diagnóstico y estadificación

Los cambios en el escenario terapéutico de los últimos años, y, sobre todo, desde la aparición de fármacos dirigidos contra dianas moleculares y el uso de la inmunoterapia, han hecho imprescindible el enfoque multidisciplinar en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón.

1.1.3.1 Diagnóstico

La valoración inicial de un paciente con sospecha de cáncer de pulmón debe incluir una buena historia clínica, una exploración física completa, analítica simple, pruebas radiológicas y la confirmación histopatológica.

Los centros de alto volumen con equipos multidisciplinarios y que disponen de comités específicos son más eficientes en la gestión de pacientes con cáncer de pulmón lo que se traduce en mejores resultados en términos de mejor estadificación, mejor adherencia a las guías y mayores tasas de supervivencia¹².

Anamnesis

Se debe realizar una correcta historia clínica incluyendo la recopilación de síntomas y signos del paciente, la exposición laboral / ambiental y la historia familiar¹³, las comorbilidades, el estado funcional del ECOG (del inglés, *Eastern Cooperative Oncology Group*) y la historia de tabaquismo.

En los últimos años, con la incorporación de la inmunoterapia al arsenal terapéutico, es indispensable preguntar por el uso de medicamentos inmunosupresoras así como la presencia de enfermedades autoinmunes y enfermedades intersticiales pulmonares¹².

Los signos y síntomas más frecuentes a nivel local son: tos (8-75%), dolor torácico (20-49%), disnea (3-60%), hemoptisis o expectoración hemoptoica (6-35%), astenia (0-10%), anorexia y pérdida de peso (0-68%), acropaquia (0-20%) y fiebre (0-20%)¹⁴.

Otros síntomas que pueden alertar son aquellos que derivan de la compresión o invasión de estructuras vecinas por extensión locorregional. Por ejemplo, dolor o la palpación de una tumoración en la pared costal, disfonía por infiltración del nervio recurrente, disfagia por compresión esofágica, disnea por aparición de derrame pleural, entre otros.

Algunos pacientes, se diagnostican en estadios avanzados de la enfermedad, y pueden presentar un síndrome constitucional (pérdida de peso inexplicable por otros motivos, astenia y anorexia). Otros síntomas pueden ser el dolor óseo secundario a lesiones óseas, alteraciones neurológicas o cefalea secundarias a metástasis cerebrales o en la médula espinal. Están descritos también los síndromes paraneoplásicos, que pueden ocurrir en alrededor del 10 % de los casos, por ejemplo: hiponatremia por SIADH (secreción inadecuada de hormona antidiurética), alteraciones del metabolismo del calcio, síndrome de Cushing, síndromes miasteniformes, etc.

Pruebas de laboratorio

Es necesario realizar también un análisis sanguíneo que incluya un hemograma completo, una bioquímica completa con niveles de calcio y pruebas de función hepática y renal^{12,13}.

En caso de que se plantee un tratamiento con inmunoterapia, es recomendable incluir en la analítica una determinación de la función tiroidea (TSH del inglés, *thyroid-stimulating hormone*) y determinación de serologías para VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) y hepatitis.

Pruebas radiológicas

a) Radiografía simple de tórax

La radiografía de tórax, en proyección anteroposterior y lateral, nos permitirá poder estimar el tamaño del tumor, si su localización es central o periférica y la relación

de la lesión con estructuras vecinas como el mediastino o la pleural (si se asocia a derrame pleural), si existe una atelectasia asociada, etc.

Una radiografía normal en un paciente con sospecha de neoplasia pulmonar no debe descartar la realización de otras pruebas, ya que hasta el 20-25 % de los casos de la radiografía no es capaz de detectar los casos de cáncer de pulmón¹³.

b) Tomografía Axial computerizada (TC) de tórax- abdomen superior

Se debe realizar una TC en todos aquellos pacientes con sospecha de cáncer de pulmón. Ésta debe influir el tórax, pero también la parte superior del abdomen (al menos incluyendo hígado y ambas glándulas suprarrenales)^{12,13}. La TC se debe realizar con contraste endovenoso en la medida de lo posible. En pacientes con alergia al contraste yodado, se puede optar por una pauta de desensibilización o realizar una Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de tórax.

c) Tomografía por emisión de positrones (PET/TC) con Fluor-18-fluorodesoxiglucosa (18F-FDG)

Se recomienda la realización de La PET-TC con 18F-FDG en aquellos casos: subsidiarios de: tratamiento con intención radical, con sospecha de lesiones metastásicas óseas como alternativa a la gammagrafía ósea o cuando se sospeche enfermedad oligometastásica subsidiaria de tratamiento local con intención radical de todas las localizaciones.

d) Estudio cerebral

Se recomienda la realización de estudio de sistema nervioso central (SNC) en todos los pacientes diagnosticados de un CPCNP, preferiblemente con RMN con contraste de gadolinio¹². Además, en aquellos casos con síntomas neurológicos se considera imprescindible disponer de una imagen del sistema nervioso central.

e) Diagnóstico cito-histológico

▪ Broncoscopia

La broncoscopia es el procedimiento de elección para la obtención de material para el estudio cito-histológico. Es una técnica ideal para lesiones grandes y centrales, y ofrece la ventaja de tener una mínima morbilidad. Se recomienda realizar una TC antes

del procedimiento de la broncoscopia ya que esto incrementa significativamente el rendimiento¹⁵. La broncoscopia permite realizar diversas técnicas para la obtención de tejido como el aspirado, lavado broncoalveolar, punción, cepillado, biopsia bronquial o transbronquial, biopsia guiada por navegador, fluoroscopia, etc. Su rendimiento diagnóstico en tumores por endoscopia es de entre 65-90%^{12,16}.

- PAAF – EBUS – EUS

En aquellos pacientes con sospecha de afectación ganglionar mediastínica, la broncoscopia permite también la evaluación cito-histológica de los ganglios linfáticos regionales. Como primera opción, ésta se realizará mediante PAAF (punción aspiración con aguja fina), EBUS (del inglés, *Endobronchial Ultrasound*) y/o EUS (del inglés, *Endoscopic Ultrasound*), por ser menos invasivas que la mediastinoscopia. A través de estos procedimientos también se pueden conseguir bloques celulares que pueden ser analizados como biopsias tumorales. La combinación de la broncoscopia con estas técnicas aumenta el rendimiento diagnóstico. La sensibilidad y especificidad del EBUS se sitúa en torno al 93 y 92% respectivamente^{12,17,18}.

- Mediastinoscopia

La mediastinoscopia se realizará cuando las otras pruebas sean negativas o no se disponga de resultados, para la correcta estadificación de afectación ganglionar en mediastino y exista alta sospecha de posible afectación tumoral a dicho nivel. La sensibilidad de la mediastinoscopia es del 86%, con un valor predictivo negativo del 94,5%¹⁸.

- Punción transtorácica guiada por TC

En caso de lesiones periféricas, y en casos en que no se puede establecer el diagnóstico por técnicas broncoscópicas y la lesión sea accesible, la PAAF o biopsia con aguja gruesa (preferiblemente) guiada por TC es el procedimiento más recomendado.

- Otras técnicas

Existen otras técnicas diagnósticas que pueden ser necesarias para la obtención de material, en caso de que no se haya podido conseguir material mediante otras técnicas. Por ejemplo, la toracocentesis en caso de derrames pleurales, y procedimientos

quirúrgicos como la pleuro o toracoscopia la toracotomía, VAMLA (del inglés, *video-assisted mediastinoscopia lymphadenectomy*), etc.

En caso de ser accesibles, también se pueden realizar biopsias de metástasis extratorácicas, que también se consideran adecuadas para el diagnóstico (las muestras de lesiones óseas, debido al proceso de descalcificación, puede hacer inservible el tejido para el correcto genotipado).

f) Otras pruebas

Otras pruebas que pueden ser necesarias durante el proceso diagnóstico son aquellas que evaluarán la capacidad pulmonar del paciente (por ejemplo, la espirometría), sobre todo necesarias en caso de que se vaya a plantear un tratamiento local con cirugía o radioterapia. Puede ser necesaria también una espiro-ergometría en algunos casos.

1.1.3.2 Estadificación

Para la estadificación del carcinoma pulmonar de célula no pequeña (CPCNP) se utiliza el sistema TNM, que se basa en la extensión anatómica del tumor primario (T), la afectación ganglionar locorregional (N) y la presencia de metástasis a distancia (M).

La estadificación tiene implicaciones diagnósticas, terapéuticas y también pronósticas. Los tumores con resultados similares en cuanto a pronóstico y supervivencia se agrupan por estadios, que van desde el I al IV y ello permite seleccionar el mejor el abordaje terapéutico. La estadificación del cáncer de pulmón de no célula pequeña se realiza de acuerdo con el Sistema de la Unión Internacional contra el Cáncer (UICC) y de la AJCC (del inglés, *American Joint Committee on Cancer*)(8ª edición). A continuación, se muestra una tabla que refleja el TNM y sus diferentes categorías.

Tabla 1: Clasificación TNM del CPCNP (8ª edición AJCC)¹⁹.

a) T - Tumor primario

Tx	El tumor primario no puede ser evaluado	
T0	Sin evidencia de tumor primario	
T1	Tumor ≤ 3 cm en su diámetro mayor, rodeado por parénquima pulmonar o pleura visceral, sin evidencia endoscópica de invasión más proximal que del bronquio lobar	
	T1a(mi)	Adenocarcinoma mínimamente invasivo
	T1a	Tumor ≤ 1 cm en su diámetro mayor
	T1b	Tumor >1 cm pero ≤ 2 cm
	T1c	Tumor >2 cm pero ≤ 3 cm
T2	Tumor > 3 cm pero ≤ 5 cm; o tumor con cualquiera de las siguientes características: afecta el bronquio principal (sin afectar carina), invade la pleura visceral, asociado con atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende hasta la región hilar	
	T2a	Tumor >3 cm pero ≤ 4 cm
	T2b	Tumor > 4 cm pero ≤ 5 cm
T3	Tumor > 5 cm pero ≤ 7 cm o que invade directamente cualquier a de las siguientes estructuras: pared torácica, nervio frénico, pericardio parietal; o existencia de nódulo(s) tumoral(es) en el mismo lóbulo que el tumor primario	
T4	Tumor > 7 cm o que invade directamente cualquier a de las siguientes estructuras: diafragma, mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpo vertebral, carina o existencia de nódulo(s) tumoral(es) separado (s), en un lóbulo ipsilateral diferente del lóbulo del tumor primario	

b) N – Afectación ganglionar

Nx	Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados
N0	Sin evidencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis en los ganglios linfáticos peribronquiales i/o hiliares ipsilaterales i intrapulmonares, incluyendo la afectación por extensión directa
N2	Metástasis en los ganglios linfáticos mediastínicos ipsilaterales y/o subcarinales
N3	Metástasis en los ganglios linfáticos mediastínicos contralaterales, hiliares contralaterales, escalenos o supraclaviculares ipsilaterales o contralaterales

c) M- Metástasis a distancia

M0	Sin evidencia de metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia
M1a	Nódulos tumorales separados del tumor primario en el pulmón contralateral; nódulos pleurales o pericárdicos; o derrame maligno pleural o pericárdico
M1b	Metástasis extratorácica única y en un único órgano
M1c	Múltiples metástasis extratorácicas en un o diversos órganos

d) Estadios del CPCNP según la 8ª edición del TNM

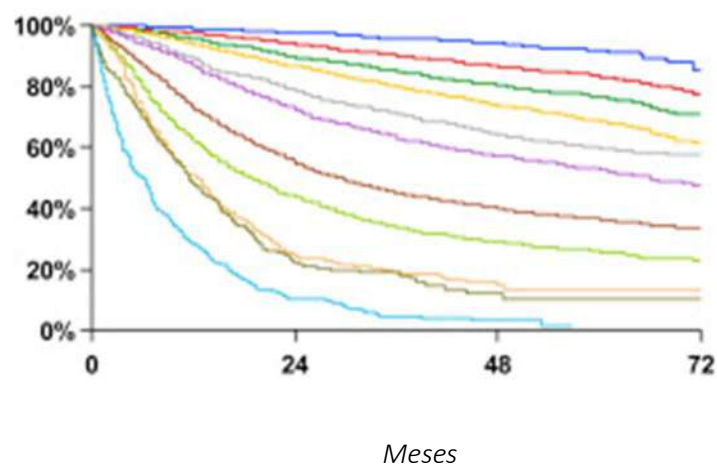
Estadio	T	N	M
Oculto	Tx	N0	M0
0	Tis	N0	M0
IA1	T1a(mi)T1a	N0	M0
IA2	T1b	N0	M0
IA3	T1c	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
IIB	T1a-T2b	N1	M0
	T3	N0	M0

IIIA	T1a-T2b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0/N1	M0
IIIB	T1a-T2b	N3	M0
	T3/T4	N2	M0
IIIC	T3/T4	N3	M0
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a/M1b
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1c

Un gran porcentaje de los pacientes se diagnostican en estadios avanzado, motivo por el cual la tasa de mortalidad por cáncer de pulmón es tan alta. Hasta el 38 % de los pacientes se diagnostica en estadio IV y un 31 % es estadio III, mientras que el 31 % lo hace en estadio I-II²⁰.

En la siguiente figura se detalla la supervivencia global (SG) en función de los estadios.

Figura 2: Supervivencia global del CPNCP según la clasificación TNM 8ª Edición (Adaptado de Goldstraw et al. Journal of Thoracic Oncology, 2016)



Estadio	Muertes/N	Mediana de supervivencia	24 meses	60 meses
IA1	68/781	NR	97%	92%
IA2	505/3105	NR	94%	83%
IA3	546/2417	NR	90%	77%
IB	560/1928	NR	87%	68%
IIA	215/585	NR	79%	60%
IIB	605/1453	66,0	72%	53%
IIIA	2052/3200	29,3	55%	36%
IIIB	1551/2140	19,0	44%	26%
IIIC	831/986	12,6	24%	13%
IVA	336/484	11,5	23%	10%
IVB	328/398	6,0	10%	0%

Dados los avances en investigación en los últimos años, ha surgido la necesidad de actualizar la clasificación TNM y está previsto que en enero de 2025 entre en vigor la nueva clasificación (9ª edición). En la 9ª edición se validan los cambios en la T introducidos en la 8ª edición, se subdivide el N2 y la M en diferentes categorías. Esto también conllevará una reorganización en los estadios, fundamentalmente en los IIA, IIB, IIIA y IIIB²¹.

1.1.4 Clasificación histopatológica, inmunohistoquímica y molecular

La clasificación de tumores de la OMS es esencial para el manejo y tratamiento clínico del cáncer de pulmón.

La última Clasificación de Tumores Torácicos de la OMS es de 2021. La edición previa de 2015 introdujo cambios importantes, debido al progreso en la comprensión de la genética y las terapias dirigidas y se enfatizó en el uso de la inmunohistoquímica (IHC) para hacer la clasificación más precisa. En 2021 Los principios siguen siendo los de usar primero la morfología, respaldada por la IHC pero hay un mayor énfasis en los avances de la patología molecular en todos los tipos de tumores²².

Entre 2013 y 2016, la mortalidad por CPCNP disminuyó más rápido que su incidencia. Esto se debe a una mejora sustancial en la supervivencia por la aprobación de terapias dirigidas en pacientes cuyos tumores presentan alteraciones genómicas específicas en *EGFR* y *ALK*. Además, se espera que el impacto de los nuevos fármacos dirigidos a otras alteraciones genéticas como *ROS1*, *RET*, *NTRK1-3*, *BRAF*, *MET* y *HER2*, así como la inmunoterapia y la implementación de técnicas de detección temprana, mejoren aún más la tasa de supervivencia a 5 años del CPCNP en los próximos años²².

De los tumores epiteliales, el cáncer de pulmón de célula no pequeña supone el 80-90% de todos los diagnósticos y se divide principalmente en 2 subgrupos: escamosos y no escamosos (que incluye adenocarcinoma y carcinoma de células grandes). El carcinoma de pulmón de célula pequeña constituye el 15 % aproximadamente de las neoplasias pulmonares²³.

En cuanto a la distribución de los tipos histológicos de CPCNP, existe un aumento continuo en el adenocarcinoma de pulmón (siendo éste mayor del 40% de los diagnósticos en CPCNP) y una disminución en las tasas de carcinoma de células escamosas¹². La distinción entre carcinomas escamosos y no escamosos es especialmente importante. Esta distinción se realizará mediante tinciones convencionales (Papanicolaou, hematoxilina-eosina) y, a menudo, con la ayuda de la IHC (la expresión de TTF1, CK7 y napsina es más frecuente en el subtipo adenocarcinoma, mientras que la de p40, p60 y CK5/6 en el subtipo escamoso)^{24,25}.

Además de la clasificación histológica, en CPCNP es importante la clasificación IHC y molecular a fin de poder permitir la correcta identificación del subtipo tumoral y poder ofrecer decisiones de tratamiento individualizadas.

1.1.4.1 Caracterización Molecular del CPCNP

Las guías de la ESMO (del inglés, *European Society of Medical Oncology*) recomiendan realizar pruebas moleculares en pacientes con carcinoma avanzado de células no escamosas y no se recomiendan en pacientes con un diagnóstico de certeza de carcinoma de células escamosas, salvo en pacientes jóvenes (<50 años), que nunca han fumado (<100 cigarrillos en su vida) o que han sido fumadores ligeros (≤15 paquetes-

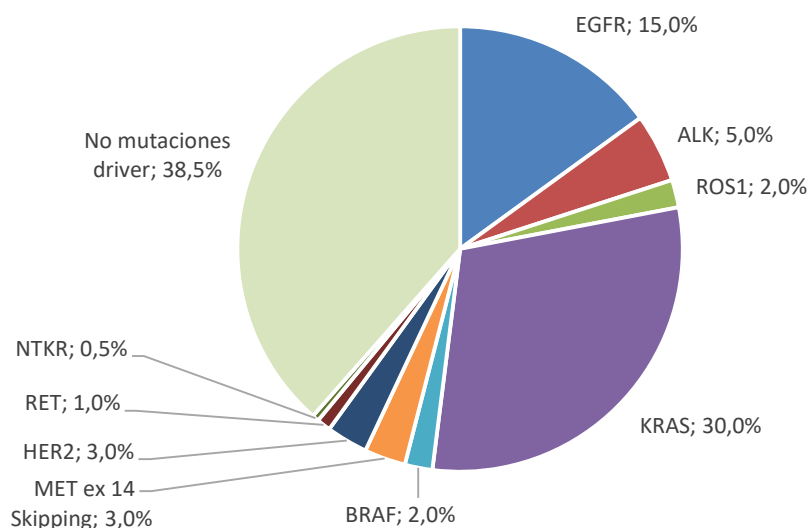
año, todo tipo de tabaco) o exfumadores de largo plazo (dejaron de fumar hace más de 15 años, todo tipo de tabaco)¹². Se recomienda testar:

- Mutaciones de *EGFR*. Se deben determinar las mutaciones en los exones 18-21. Es obligatorio evaluar las mutaciones activadoras más comunes (deleción en el exón 19, mutación puntual L858R en el exón 21), así como la T790M en caso de recaída de la enfermedad con TKI (del inglés, *Tyrosine Kinase Inhibitors*) de primera o segunda generación sea obligatoria.
- Translocaciones de *ALK* mediante FISH (del inglés, *Fluorescence In Situ Hybridization*). La IHC puede ser una alternativa para el cribado.
- Reordenamientos de *ROS1* mediante FISH. La IHC puede utilizarse para el cribado.
- Mutación de *BRAF* V600.
- Reordenamientos de *NTRK*, mediante IHC o secuenciación de nueva generación.
- Otras alteraciones como: mutaciones de *MET* (omisión del exón 14 de *MET*, amplificaciones de *MET*), reordenaciones de *RET*, mutaciones *KRAS* G12C y mutaciones *HER2*.

Si están disponibles, se prefieren plataformas multiplex de secuenciación masiva (NGS, del inglés, *next generation sequencing*) para las pruebas moleculares. Se prefiere el NGS basado en ARN (ácido ribonucleico) para identificar genes de fusión.

El ADNc (Ácido Desoxirribonucleico Circulante) o biopsia líquida puede utilizarse para detectar mutaciones accionables o *driver*, así como mutaciones de resistencia, pero los pacientes con una prueba negativa de ADNc en sangre requieren una biopsia de tejido.

Figura 3: Alteraciones genéticas del cáncer de pulmón de células no pequeñas no escamoso ¹².



1.1.4.2 Expresión de PD-L1

Se recomienda realizar la prueba de IHC para de la proteína transmembrana PD-L1 (del inglés, *programmed death-ligand 1*) en todos los casos de CPCNP localizado, localmente avanzado o en estadio IV (tanto escamoso como no escamoso), debido a sus implicaciones terapéuticas¹².

Se pueden utilizar muestras de tipo biopsia y citología para las pruebas de IHC de PD-L1, siempre que estén adecuadamente preparadas y contengan suficiente tumor: al menos 100 células tumorales (CTs) evaluables¹².

Se considera expresión positiva aquella igual o superior al 1% de las células tumorales. A su vez, se categoriza en baja expresión (1-49%) y alta expresión (igual o superior al 50%)²⁶.

1.1.5 Factores pronósticos

Un factor pronóstico muy importante en CPCNP es el estadio de la enfermedad, determinado por la clasificación TNM. Según el estadio clínico, las tasas de supervivencia a los 5 años oscilan entre el 90% para los estadios IA1 y el 0% para los estadios IVB²⁰.

La histología también es factor pronóstico independiente. El carcinoma escamoso se ha asociado con peores resultados en supervivencia, así como los tumores con características neuroendocrinas. En el subtipo histológico de adenocarcinoma, el patrón lepidico se ha asociado con mejor pronóstico, a diferencia del adenocarcinoma papilar, micropapilar y sólido que presentan peor supervivencia²⁷.

En cuanto a los datos clínicos, el factor pronóstico más reproducible, es el performance status del paciente medido con la escala de Karnofsky o con la escala ECOG²⁸. La magnitud del consumo de tabaco al diagnóstico también es un factor independiente²⁹. El sexo femenino es también un factor bastante reproducible y su papel como factor de mejor pronóstico se ha demostrado en un metaanálisis³⁰.

1.1.6 Tratamiento del CPCNP

El abordaje terapéutico del CPCNP dependerá principalmente de la estadificación al diagnóstico, así como de las características histológicas y de caracterización molecular e IHC.

En los últimos años ha habido grandes avances en el desarrollo de terapias dirigidas a alteraciones accionables y también en inmunoterapia. Actualmente, en CPCNP sin alteraciones moleculares la inmunoterapia se ha convertido en el pilar del tratamiento. A continuación, se revisará el tratamiento del CPCNP localizado y avanzado, si bien, el tratamiento del CPCNP sin alteraciones moleculares accionables se revisará con más detalle en el apartado de Inmunoterapia y cáncer.

1.1.6.1 Enfermedad localizada. (Estadios I-II) y localmente avanzada potencialmente resecables (hasta IIIA-N2)

En la enfermedad localizada y localmente avanzada es de vital importancia el consenso dentro de un comité multidisciplinar de tumores torácicos. La cirugía es el tratamiento de elección en enfermedad localizada, aunque en aquellos pacientes que presenten alguna contraindicación para la cirugía, la radioterapia (RT) estereotáctica es una alternativa. En enfermedad potencialmente resecable, el tratamiento de elección se basa en la combinación de tratamiento sistémico seguido de tratamiento quirúrgico.

Cirugía

El tipo de cirugía depende principalmente, de la extensión de la enfermedad, la localización del tumor y de la evaluación prequirúrgica. La lobectomía o resección anatómica es preferible a la resección sublobar (segmentectomía), que se reserva para aquellos pacientes con una alteración de la función pulmonar o con comorbilidades^{31,32}; aunque en pacientes con estadio IA, la resección sublobar o segmentectomía ha demostrado no ser inferior a la lobectomía en cuanto a la supervivencia libre de enfermedad ni a la SG³³.

La disección ganglionar sistemática, que incluya al menos 6 ganglios es superior al muestreo selectivo para una correcta estadificación patológica de los ganglios linfáticos³².

El abordaje laparoscópico mediante VATS (del inglés, *video-assisted thoracoscopic surgery*) es preferible a la resección por toracotomía, ya que disminuye la mortalidad, la morbilidad y la estancia hospitalaria, sin comprometer el intervalo libre de enfermedad ni la supervivencia en comparación con la cirugía abierta^{34,35,36,37,38,39}.

Radioterapia

En pacientes no operables, con tumores menores de 5 cm y sin afectación ganglionar, la RT estereotáctica (SBRT, del inglés, *Stereotactic Body Radiotherapy*; SABR, del inglés, *Stereotactic Ablative Radiotherapy*), es una opción terapéutica recomendable. Varios estudios también han demostrado que es una alternativa en pacientes operables mayores de setenta y cinco años⁴⁰ y en aquellos que rechazan la cirugía.

La RT postoperatoria no está indicada en estadios I-II cuando la resección del tumor es completa. Puede considerarse en pacientes seleccionados con enfermedad N2 de alto riesgo, con extensión extracapsular ganglionar, compromiso de múltiples estaciones ganglionares, disección inadecuada de ganglios linfáticos, y/o pacientes que rechazan o no toleran la terapia sistémica adyuvante. Para minimizar las posibles toxicidades en pulmón y corazón, se prefieren técnicas de RT altamente conformadas, como la IMRT o la terapia con protones^{41,42}.

Tratamiento sistémico perioperatorio

▪ Quimioterapia

La quimioterapia (QT) adyuvante, con 4 ciclos de un doblete de platino, ha demostrado un beneficio en la SG, de un 4% a 5 años, en los estadios II-IIIa^{43,44,45}. No existe beneficio con el tratamiento adyuvante con QT en los estadios I (utilizando la séptima edición de la clasificación TNM), excepto en aquellos casos en los que el tumor tenga un tamaño mayor de 4 cm⁴⁶.

En cuanto a la neoadyuvancia con QT, existe una disminución del riesgo de recaída y una tasa de respuesta completa patológica del 4%.

▪ Terapia Dirigida

Existe beneficio de añadir osimertinib durante 3 años como tratamiento adyuvante tras una resección completa de CPCNP estadio IB-IIIa cuyos tumores tienen deleciones del exón 19 o mutaciones L858R en el exón 21 del *EGFR*. El estudio ADAURA demostró que en los pacientes con enfermedad en estadio II a IIIa, la SG a 5 años fue del 85% en el grupo de osimertinib y del 73% en el grupo de placebo (HR 0,49; IC del 95,03%, 0,33 a 0,73; P<0,001). En la población total (pacientes con enfermedad en estadio IB a IIIa), la SG a 5 años fue del 88% en el grupo de osimertinib y del 78% en el grupo de placebo (HR 0,49; IC del 95,03%, 0,34 a 0,70; P<0,001)^{47,48}.

Los inhibidores de *ALK* también han demostrado eficacia en este escenario. El estudio ALINA incluyó pacientes con CPCNP con translocaciones en *ALK* y tras resección completa estadio IB (tumores ≥ 4 cm), II o IIIa según la séptima edición a AJCC y demostró que alectinib adyuvante durante 24 meses mejoró significativamente la supervivencia libre de enfermedad (SLE) en comparación con la QT basada en platino⁴⁹. La SLE a los 2 años fue del 93,6% en el grupo de alectinib y del 63,7% en el grupo de QT (HR 0,24; IC del 95%, 0,13 a 0,43; P<0,001)⁴⁹.

▪ Inmunoterapia

En los últimos años la aparición de los ICIs ha cambiado el paradigma de tratamiento del CPCNP localizado / localmente avanzado mejorando significativamente los resultados en el tratamiento perioperatorio. Estos beneficios en respuesta han motivado un cambio en favor de su uso en neoadyuvancia, incluso en tumores

localmente avanzados con afectación ganglionar N2. El papel de los ICIs en el tratamiento del CPCNP localizado se abordará en el capítulo de inmunoterapia en CPCNP.

1.1.6.2 Enfermedad localmente avanzada irresecable

En los últimos años, dados los avances en el tratamiento sistémico en tasa de respuestas el concepto de enfermedad irresecable ha ido cambiando y actualmente se considera enfermedad irresecable un menor grupo de pacientes, que englobaría principalmente a aquellos con estadios IIIA con afectación N2 “bulky” o varias estaciones ganglionares afectadas, y a los IIIB y IIIC.

El tratamiento de QT basada en un doblete de platino y RT concomitante ha sido el tratamiento estándar de tratamiento para aquellos pacientes con buen estado general y sin contraindicaciones. Varios estudios aleatorizados y metaanálisis han demostrado una mayor SG en comparación con la estrategia secuencial, con un beneficio absoluto del 4,5% a los 5 años⁵⁰.

El régimen de QT recomendado es el doblete con cisplatino, siendo la combinación de cisplatino-vinorelbina, por un total de 3-4 ciclos, la preferida por haber presentado menores tasas de efectos adversos de grado 3-4⁵¹. En pacientes frágiles, la combinación de carboplatino y paclitaxel es la mejor alternativa dada su mejor tolerancia⁵².

La consolidación con durvalumab tras el tratamiento de QT-RT en aquellos pacientes con expresión positiva de PD-L1 es el estándar de tratamiento (esto se detallará en el apartado de inmunoterapia y CPCNP).

1.1.6.3 Enfermedad avanzada. Estadio IV

1.1.6.3.1 *Pacientes con CPCNP sin alteraciones moleculares accionables*

- Primera línea

La base del tratamiento de primera línea en este escenario es la combinación de QT e ICIs, sino existe contraindicación para su uso. Es por ello por lo que este capítulo se desarrollará con mayor detalle en el apartado de inmunoterapia y CPCNP.

- Segunda línea

La decisión del tratamiento de segunda línea está influenciada por la terapia recibida en primera línea. Si en primera línea el paciente ha recibido ICIs, la segunda línea estándar recomendada es docetaxel con o sin un fármaco antiangiogénico. Si el paciente no ha recibido ICIs en primera línea y no presenta contraindicación, el tratamiento de elección en segunda línea es monoterapia con anti-PD-(L)1. Esto se explicará con mayor detalle en el apartado de inmunoterapia y CPCNP.

1.1.6.3.2 Pacientes con CPCNP con alteraciones moleculares

a) Mutación de *EGFR*

Los TKIs de *EGFR* son el tratamiento de elección en primera línea para pacientes con una mutación activadora de *EGFR* (deleción del exón 19 o mutación L858R del exón 21). Se ha demostrado en varios estudios la superioridad de los TKIs de primera generación (gefitinib y erlotinib) y de segunda generación (afatinib) frente a la QT basada en platino en términos de tasa de respuesta, seguridad, calidad de vida y SLP^{53,54,55,56,57}.

Los TKIs de tercera generación, principalmente osimertinib, además, también inhiben la mutación de resistencia T790M del exón 20 de *EGFR*. Osimertinib fue comparado con los TKIs de *EGFR* de primera generación en el ensayo FLAURA de fase III (N=556), demostrando superioridad en SLP y SG, con 18,9 frente a 10,2 meses (HR 0,46, IC del 95% 0,37-0,57) y 38,6 frente a 31,8 meses (HR 0,80, IC del 95% 0,64-1,00), respectivamente^{58, 59}. La penetración a nivel de SNC también es mayor para el osimertinib en comparación con los TKIs de *EGFR* de primera y segunda generación, mostrando una tasa de respuestas en sistema nervioso central > 60%⁶⁰. Además, el perfil de seguridad de osimertinib es mejor que el de los TKIs de primera generación, con tasas de eventos adversos (EA) graves menores¹².

b) Translocación de *ALK*

Crizotinib, un TKI de *ALK* de primera generación, y ceritinib, TKI de segunda generación, demostraron superioridad frente la QT basada en platino para el tratamiento de primera línea de pacientes con CPCNP con reordenamiento de *ALK*^{61,62,63}.

Los TKIs de *ALK* de nueva generación (alectinib, brigatinib, ensartinib y lorlatinib) han demostrado ser superiores a los TKI de primera y segunda generación^{64,65,66,67}. Por tanto, alectinib, brigatinib y lorlatinib son los fármacos de primera elección para el tratamiento de primera línea¹².

c) Reordenamiento de *ROS1*

Crizotinib fue el primer TKI aprobado para el tratamiento del CPCNP avanzado con reordenamiento de *ROS1*, basado en los resultados de la cohorte de expansión del estudio de fase I PROFILE 1001, que mostró una tasa de respuesta objetiva (TRO) fue del 72%, SLP de 19,3 meses y SG fue de 51,4 meses⁶⁸.

Entrectinib es un TKI de *ROS1* y *NTRK* de nueva generación. Entrectinib ofrece una TRO del 67%, SLP de 15,7 meses. Para los pacientes con metástasis cerebrales basales la TRO intracraneal es del 79%, la SLP de 12 meses y la SG de 28,3 meses⁶⁹. Entrectinib, si está disponible, se prefiere sobre crizotinib en pacientes con metástasis cerebrales, basándose en estos resultados.

Repotrectinib, un TKI de nueva generación, con actividad sobre *ROS1*/TRK/*ALK* de, ha mostrado también una actividad prometedora⁷⁰.

d) Otras alteraciones que pueden ser tratadas con terapia dirigida son:

- **Mutación en *BRAF*:** la combinación de dabrafenib y trametinib está recomendada para el tratamiento de pacientes con CPNM avanzado o metastásico mutado *BRAF* V600 (el ensayo solo incluyó pacientes positivos para V600E)⁷¹.
- ***RET*:** el tratamiento recomendado para pacientes con CPCNP positivo para fusiones de *RET* es selpercatinib o pralsetinib^{72,73,74}.
- ***MET* exón 14 “skipping mutation” o amplificaciones en *MET*:** dos inhibidores de *MET* han obtenido aprobación regulatoria para pacientes con mutaciones por omisión del exón 14 de *MET*: capmatinib y tepotinib^{75,76}.
- ***HER2* exón 20:** en pacientes con mutaciones en el exón 20 de *HER2*, se recomienda trastuzumab deruxtecan^{77,78}.
- ***NTRK*:** larotrectinib y entrectinib se recomiendan para pacientes con fusión del gen *NTRK*^{79,80}.

- **KRAS G12C:** Sotorasib y adagrasib están recomendados en aquellos pacientes que han recibido previamente QT basada en platino y ICI^{81,82}.
- **Inserciones del exón 20 de EGFR:** Amivantamab es una opción para pacientes con tumores que progresan a QT de doblete de platino⁸³.

1.2 Inmunoterapia

1.2.1 Bases de la inmunología y el cáncer

El sistema inmunológico, tradicionalmente se ha dividido en 2 subgrupos, el sistema innato y el sistema adaptativo. El sistema innato es la primera línea de defensa. Actúa de manera rápida e inespecífica. Está formado por los macrófagos, las células dendríticas, las células NK y sustancias solubles como el IFN. El sistema adaptativo es más específico y tardío, y está formado por linfocitos T y B, que reconocen y responden a antígenos específicos. Después de la primera activación, se genera la memoria inmunológica, que permite una respuesta más rápida y eficaz en exposiciones posteriores^{84,85}.

La capacidad del sistema inmunológico para detectar y eliminar células tumorales depende en gran medida de la presentación de antígenos tumorales por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*). Existen dos tipos de MHC:

- **MHC de Clase I:** Se expresa en las células nucleadas del organismo. Así, las células tumorales presentan fragmentos de proteínas (péptidos) derivados de las mutaciones a los linfocitos T citotóxicos (CD8+). Si estos reconocen a los péptidos como no propios, se activan proliferan y destruyen a aquellas células que presenten ese antígeno, que en este caso son las células tumorales.
- **MHC de Clase II:** Se expresa principalmente en células presentadoras de antígenos (como macrófagos, células dendríticas y linfocitos B). Después de fagocitar a una célula tumoral, las células presentadoras de antígenos procesan sus antígenos tumorales y los presentan a los linfocitos T *helper*, activándolos; lo que conlleva la secreción de citocinas que atraerán a otras células del sistema inmune, como los

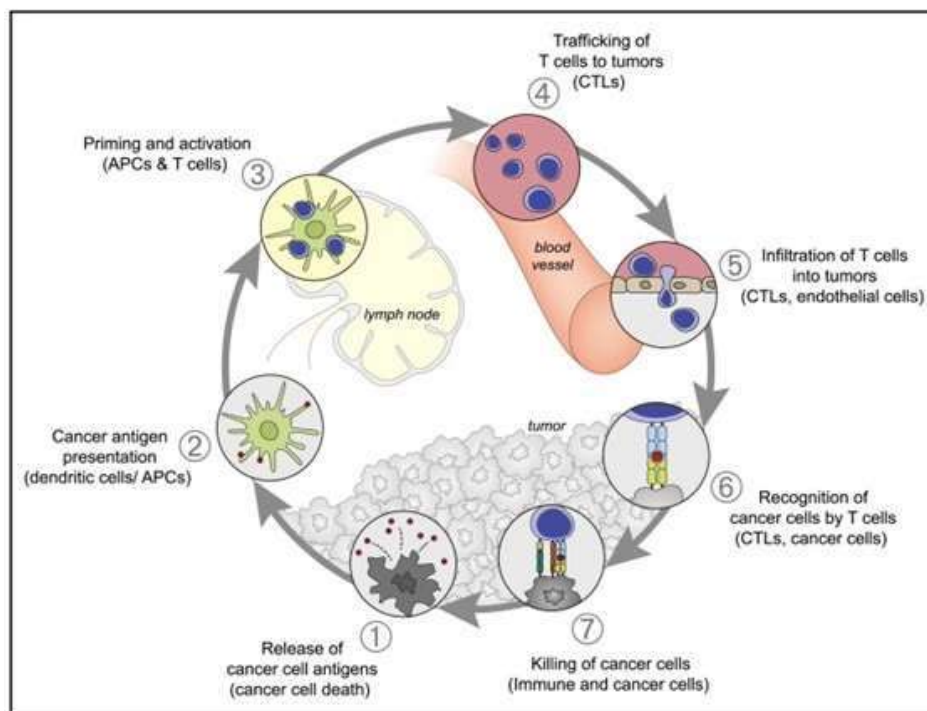
linfocitos citotóxicos para que reconozcan y actúen de manera específica contra estas células extrañas tumorales a través de su receptor (TCR, del inglés *T cell receptor*) y el MHC de éstas⁸⁴.

El concepto de inmunovigilancia, descrito por primera vez por Ehrlich en 1909 y se basa en que las células de nuestro organismo sufren mutaciones continuamente, pero el sistema inmunitario es capaz de detectarla y eliminarlas^{85,86}.

Para que una respuesta inmunitaria conduzca a la eliminación efectiva de las células cancerígenas, se deben suceder una serie de eventos o pasos que se conoce como el Ciclo de la Inmunidad contra el Cáncer⁸⁶. En el primer paso, los neoantígenos creados por las células cancerígenas se liberan y son capturados por las células dendríticas para su procesamiento, paso 1. En el paso 2, las células dendríticas presentan los antígenos capturados en moléculas de MHC I y MHC II a los linfocitos T, lo que resulta en la fase 3. Esta fase consiste en la activación y preparación de respuestas de linfocitos T efectores contra los antígenos específicos del cáncer. Finalmente, los linfocitos T efectores activados en los ganglios linfáticos, se desplazan (paso 4) e infiltran el lecho tumoral (paso 5), reconocen y se unen específicamente a las células cancerígenas mediante la interacción entre su receptor de células T (TCR) y su antígeno correspondiente unido a MHC I (paso 6), y en el caso de linfocitos citotóxicos, matan a su célula cancerígena (paso 7). La eliminación de la célula cancerígena libera más antígenos asociados al tumor iniciando de nuevo el ciclo (paso 1 nuevamente).

En los pacientes con cáncer, el Ciclo de la Inmunidad contra el Cáncer no funciona de manera óptima. Las células tumorales pueden modificar la respuesta inmunológica, escapando a su reconocimiento y destrucción para continuar expandiéndose, lo que se conoce como *immune editing*⁸⁶.

Figura 4. Ciclo de Inmunidad y Cáncer. Extraída de Chen D, et al. Immunity 2013⁸⁶.



Uno de los mecanismos por los cuales las células tumorales escapan del reconocimiento inmunitario es mediante la inhibición de las células inmunitarias del huésped a través de la interacción con moléculas reguladoras en la superficie de estas, también llamadas moléculas de puntos de control o *checkpoint*, como CTLA-4 y PD-1^{85,87}.

CTLA-4

CTLA-4 es un receptor transmembrana que se expresa en la superficie de los linfocitos T y tiene un potente papel inhibitor en su regulación, sobre todo en la fase 3 del ciclo celular a nivel de ganglios linfáticos en la fase de activación de los linfocitos T.

En las células T en reposo, el CTLA-4 es una proteína intracelular; sin embargo, después de la activación del receptor de células T y de recibir una señal coestimuladora a través de CD28, el CTLA-4 se transloca a la superficie celular, donde compite con CD28 por la unión a moléculas coestimuladoras críticas, B7.1 y B7.2, y media señales inhibitorias en la célula T, resultando en el arresto tanto de la proliferación como de la activación⁸⁸.

PD-1

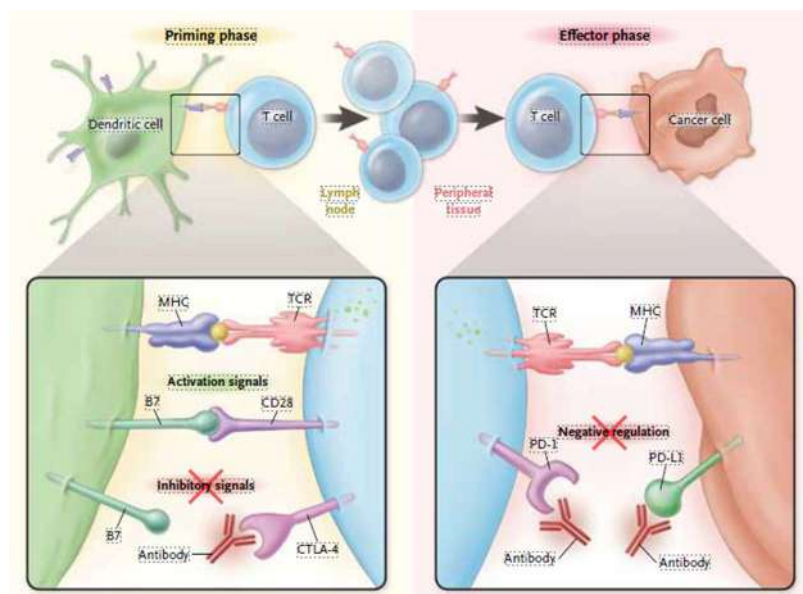
PD-1 es una proteína de control inmunitario que se encuentra en la superficie de ciertas células del sistema inmunitario: células dendríticas, macrófagos y células NK, con predominancia en células T CD8+ activadas, células T CD4+ y linfocitos B en tejidos periféricos. Su función principal es actuar como un "freno" para el sistema inmunitario, ayudando a prevenir que ataque de manera descontrolada a las células del propio organismo y causando daño en tejidos sanos.

PD-1 se activa cuando se une a sus ligandos, PD-L1 o PD-L2, proteínas que pueden estar presentes en células presentadoras de antígenos y células tisulares, incluidas las células tumorales. Esta interacción entre PD-1 y PD-L1/PD-L2 envía señales que disminuyen la actividad de las células inmunitarias, lo que ayuda a algunos tumores a escapar del sistema inmunitario y a continuar creciendo sin ser detectados ni destruidos^{88,89}.

Por lo tanto, tanto CTLA-4 como PD-1 son reguladores fisiológicos negativos de la activación del linfocito T, de las cuales las células tumorales se aprovechan para evadir el sistema inmunológico.

Figura 5. PD-1 y CTLA-4. Extraída de Ribas A, et al. New England Journal Medicine, 2012

90 .



1.2.2 Puntos de control inmunológico y CPCNP

El descubrimiento de puntos de control inmunológicos o *immune checkpoints*, ha abierto la puerta al desarrollo de múltiples fármacos que promueven la respuesta contra las células tumorales, lo que conocemos como inmunoterapia.

El bloqueo tanto de CTLA-4 como de PD-1 y/o PD-L1 resulta en un aumento de la actividad de los linfocitos T efectores, así como en la inhibición de los linfocitos T reguladores, restableciendo la respuesta inmunológica. Es con base en esto que se han desarrollado diversos anticuerpos monoclonales contra CTLA-4, PD-1 y PD-L1.

Actualmente existen varios fármacos aprobados en múltiples indicaciones terapéuticas.

Tabla 2. Clasificación de los inhibidores de los puntos de control inmunitarios.

anti-CTLA-4	anti-PD-1	anti-PD-L1
Ipilimumab	Nivolumab	Atezolizumab
Tremelimumab	Pembrolizumab	Durvalumab
	Cemiplimab	Avelumab
	Toripalimab	

1.2.2.1 Tratamiento del CPCNP

1.2.2.1.1 *Enfermedad localizada. (Estadios I-II) y localmente avanzada potencialmente resecables (hasta IIIA-N2)*

- Adyuvancia

Se han publicado datos de beneficio de la inmunoterapia en adyuvancia de forma que éstos ya forman parte del arsenal terapéutico en esta indicación. En la tabla 3 se resumen los datos de los principales estudios.

Tabla 3. Estudios en adyuvancia con inmunoterapia en CPCNP

Fármaco y estudio	Población	SLE
IMpower-010 ⁹¹ - atezolizumab adyuvante 1200 mg cada 3 sem x 16 ciclos - tratamiento de soporte	CPCNP estadio IB-IIIa completamente resecado y con QT adyuvante previa	- estadios II-IIIa: 42,3 vs 35,3 meses; HR 0,79 - en población PD-L1 ≥1% en células tumorales: (HR 0,66)
KEYNOTE-091 o PEARS ⁹² - pembrolizumab 200 mg cada 3 sem por 18 ciclos. - placebo	CPCNP estadio IB-IIIa completamente resecado y con QT adyuvante previa	- 53,6 meses vs 42,0 meses (HR 0,76)

Abreviaturas: SLE, supervivencia libre de enfermedad; HR, *hazard ratio*; mg, miligramos; Sem, semanas; sem, semanas, IC, intervalo de confianza, PD-L1 , *Programmed Death Ligand-1*

○ Tratamiento perioperatorio

Como hemos comentado, la QT, en el escenario de neoadyuvancia, puede reducir el riesgo de recaída y ofrece un porcentaje de respuesta completa patológica (RCp) del 4%. Es por ello, que este escenario ha sido de gran interés en los últimos años, con la intención de mejorar estos resultados, y se han realizado varios estudios que combinan la QT con fármacos dirigidos contra PD-(L)1. En la tabla 4 se resumen los resultados de los principales estudios fase 3 de tratamiento perioperatorio.

Tabla 4. Estudios fase 3 de tratamiento perioperatorio con inmunoterapia en CPCNP

Fármaco y estudio	Población	RCp	SLEv
CheckMate-816 ^{93,94} - QT neoadyuvante basada en platino → cirugía - QT neoadyuvante con nivolumab → cirugía	estadio IB-IIIa resecables	24% vs 2,2% (HR 13,94)	43,8 vs 18,4 meses (HR 0,66)
KEYNOTE-671 ^{95,96} - QT basada en cisplatino + pembrolizumab neoadyuvante x 4 ciclos → cirugía → pembrolizumab x 13 ciclos - QT basada en cisplatino + placebo neoadyuvante x 4 ciclos → cirugía → placebo x 13 ciclos	estadio II, IIIa o IIIB	18,1% vs 4,0%	47,2 vs 18,3 meses (HR 0,59).
AEGEAN ⁹⁷ - QT basada en platino + durvalumab x 4 ciclos → cirugía → durvalumab 12 ciclos - QT basada en platino + placebo x 4 ciclos → cirugía, → placebo x 12 ciclos	CPCNP resecable en estadios II a IIIB (N2)	17,2% vs 4,3%	25,9 vs NA meses (HR 0,68)
CheckMate-77T ⁹⁸ - QT + nivolumab neoadyuvante x 4 ciclos → cirugía → nivolumab x 1 año - QT + placebo neoadyuvante x 4 ciclos → cirugía → placebo x 1 año	estadio IIA a IIIB	25,3% vs 4,7% (HR 6,64)	18,4 vs NA meses (HR 0,58)

Abreviaturas: QT, quimioterapia; SLEv, supervivencia libre de evento; HR, *hazard ratio*; Sem, semanas; RCp, respuesta completa patológica; NA, no alcanzado.

1.2.2.1.2 Enfermedad localmente avanzada irresecable

A raíz de los resultados de estudio PACIFIC, actualmente, la consolidación con durvalumab tras QT-RT se considera el tratamiento recomendado para pacientes con CPCNP localmente avanzado irresecable. El estudio PACIFIC incluyó pacientes con estadios III de CPCNP que hubieran recibido QT-RT concomitante, sin progresión, y se asignaron a recibir durvalumab 10 mg /Kg cada 2 semanas o placebo, por 12 meses. Durvalumab demostró beneficio en tasas de SLP (16,9 meses frente a 5,6 meses HR 0,55) y en SG (47,5 meses frente a 29,1 meses con un a HR de 0,72), sin embargo el beneficio fue mayor en aquellos pacientes con expresión tumoral positiva para PD-L1 hecho que

ha llevado a la aprobación del fármaco en Europa solo para aquellos pacientes con expresión de PD-L1 positiva^{99,100}.

1.2.2.1.3 Enfermedad avanzada. Estadio IV

a) Primera línea

En la estrategia de tratamiento se debe incluir la consideración de la histología, la expresión de PD-L1, las comorbilidades del paciente, sus preferencias y su estado general.

Una combinación de QT basada en platino más anti-PD-(L)1 es el enfoque de tratamiento más común para un paciente con diagnóstico reciente de CPCNP estadio IV. La monoterapia con anti-PD(L)1 es otra opción para aquellos pacientes con alta expresión de PD-L1 y buen estado general¹².

Varios regímenes combinados con ICI han demostrado una mejor SG en comparación con la QT sola. Estos incluyen QT basada en platino más de combinación de diferentes agentes de inmunoterapia con anti-PD-(L)1 +/- anti-CTLA-4 . A continuación de explican las principales combinaciones:

- Pembrolizumab + QT

El estudio fase 3 KEYNOTE-189 incluyó pacientes con CPCNP no escamoso que fueron asignados aleatoriamente a recibir pemetrexed y platino más pembrolizumab o placebo, seguidos de pemetrexed más pembrolizumab o pemetrexed más placebo como tratamiento de mantenimiento. La adición de pembrolizumab tuvo un impacto positivo térmicos de SG (mediana de SG de 22,0 meses en el grupo de combinación frente a 10,6 meses en el grupo de QT sola, HR 0,56) y en SLP 9 meses en la combinación frente a 4,9 meses en el de placebo)^{101,102}. Basado en los resultados de KEYNOTE-189, la combinación de pembrolizumab con pemetrexed y QT basada en platino debe considerarse una opción estándar en el tratamiento del CPCNP no escamoso metastásico.

El estudio KEYNOTE-407 evaluó la combinación de pembrolizumab + carboplatino + paclitaxel o nab-paclitaxel, seguido de pembrolizumab frente a la misma QT con placebo como tratamiento de mantenimiento, en CPCNP de histología escamosa. Fue un estudio positivo con una mediana de SG de 15,9 meses en el grupo de combinación frente a 11,3 meses en el grupo de QT sola (HR 0,64)^{103,104}. Los resultados de KEYNOTE-407 colocan la

combinación de pembrolizumab más carboplatino y nab-paclitaxel como la opción estándar en pacientes con carcinoma de células escamosas metastásico.

- Atezolizumab + bevacizumab + carboplatino + pemetrexed

En el estudio IMpower150 los pacientes fueron asignados aleatoriamente a recibir QT (carboplatino y paclitaxel) con bevacizumab, QT con atezolizumab o QT con atezolizumab más bevacizumab. El estudio mostró que la combinación de atezolizumab con bevacizumab y QT mejoró significativamente la SLP y la SG en comparación con la QT estándar (mediana de SG en el brazo experimental de 19,5 meses vs 14,7 meses en el grupo de control de bevacizumab + quimioterapia, HR 0,80). Los resultados de IMpower150 posicionan la combinación de atezolizumab, bevacizumab, carboplatino y paclitaxel como una opción terapéutica más en pacientes con carcinoma no microcítico no escamoso metastásico^{105,106}.

- Nivolumab + ipilimumab + QT

El estudio CheckMate-9LA incluye paciente con CPCNP con histología escamosa y no escamosa. Los pacientes fueron asignados aleatoriamente, a recibir QT x 2 ciclos, más ipilimumab y nivolumab, o solo QT estándar. Se observó una ventaja en SG a favor de la combinación, mediana de SG de 15,8 meses frente a 11 meses (HR 0,72, IC 95%: 0,61-0,86)¹⁰⁷.

- Atezolizumab + QT

El estudio IMpower130 evaluó atezolizumab en combinación con QT con CBDCA y nab-paclitaxel en primera línea de tratamiento en 724 pacientes con CPCNP no escamoso, avanzado. La combinación con atezolizumab mejoró la SG de los pacientes con una mediana de 18,6 meses frente a 13,9 meses en la rama de combinación vs la de QT sola, respectivamente (HR 0,79, IC 95%: 0,64-0,98, p = 0,033)¹⁰⁸.

- Cemiplimab + QT

El estudio EMPOWER-Lung 3 incluyó pacientes con histología escamosa o no escamosa. Los pacientes fueron asignados a recibir cemiplimab más QT versus placebo más quimioterapia. La mediana de SG en fue de 21,9 meses en el brazo de cemiplimab

con QT frente a 13,0 meses en el brazo de QT (HR 0,71, IC del 95%: 0,53–0,93, p = 0,014)¹⁰⁹.

Tabla 5: Estudios fase III de combinación de QT con ICIs en CPCNP.

Fármaco y estudio	Población	SLP	SG
KEYNOTE-189 ¹⁰² - Pembrolizumab 200 mg + CBDCA AUC5/cisplatino 75 mg/m ² + pemetrexed 500 mg/m ² cada 3 sem x 4 ciclos --> pembrolizumab + pemetrexed - Placebo + CBDCA/cisplatino + pemetrexed x 4 ciclos --> placebo + pemetrexed	No escamoso	9 vs. 4,9 meses (HR 0,48)	22,0 vs. 10,6 meses (HR 0,56)
IMpower150 ¹⁰⁶ - Atezolizumab 1200 mg + CBDCA AUC6 + paclitaxel 200 mg/m ² cada 3 sem x 4-6 ciclos --> Atezolizumab - Atezolizumab + CBDCA + paclitaxel + bevacizumab 15 mg/kg x 4-6 ciclos --> Atezolizumab + bevacizumab - CBDCA + paclitaxel + bevacizumab --> bevacizumab	No escamoso	8,3 vs 6,8 meses (HR 0,50)*	19,5 vs. 14,7 meses (HR 0,80)*
CheckMate-9LA ¹⁰⁷ - Nivolumab 360 mg cada 3 sem + ipilimumab 1 mg/kg cada 6 sem + QT platino x 2 ciclos vs QT basada en platino x 4 ciclos	Escamoso y no escamoso	6,4 vs 5,3 meses (HR 0,70)	15,8 vs. 11,0 meses (HR 0,72)
IMpower130 ¹⁰⁸ - Atezolizumab 1200 mg + CBDCA AUC6 cada 3 sem + nab-paclitaxel 100 mg/m ² /1set x 4-6 ciclos --> Atezolizumab - CBDCA + nab-paclitaxel --> BSC o pemetrexed 500 mg/m ²	No Escamoso	7 vs. 5,5 meses (HR 0,64)	18,6 vs. 13,9 meses (HR 0,79)
KEYNOTE-407 ^{103,104} - Pembrolizumab 200 mg + CBDCA AUC6 + paclitaxel 200 mg/m ² cada 3 sem o nab-paclitaxel 100 mg/m ² cada 1 sem x 4 ciclos --> pembrolizumab - Placebo + CBDCA + paclitaxel/nab-paclitaxel x 4 ciclos --> placebo	Escamoso	6,4 vs. 4,8 meses (HR 0,56)	15,9 vs. 11,3 meses (HR 0,64)
EMPOWER-Lung 3 - Cemiplimab 350 mg + QT platino cada 3 sem x 4 ciclos --> cemiplimab - Placebo + QT platino cada 3 sem x 4 ciclos	Escamoso y no escamoso	8,2 vs. 5,5 meses (HR 0,55)	21,9 vs. 12,9 meses (HR 0,65)

Abreviaturas: SLP, supervivencia libre de progresión; SG, supervivencia global; HR, *hazard ratio*; CBDCA, carboplatino; AUC, *area under the curve* (o área bajo la curva); mg, miligramos; kg, Kilogramos; m², metros cuadrados; Sem, semanas; BSC, *best supportive care*.

* comparación final entre las ramas de CBDCA-paclitaxel-bevacizumab +/- atezolizumab

En los pacientes con CPCNP estadio IV, tanto con histología escamosa y no escamosa, con buen estado general y con alta expresión de PD-L1 tienen indicación de tratamiento con fármacos anti-PD-(L)1, ya sea en monoterapia como en combinación con un doblete de platino y ambas son opciones válidas.

Existen varios fármacos aprobados con la indicación de su uso en monoterapia: pembrolizumab, atezolizumab y cemiplimab.

- Pembrolizumab

En el estudio KEYNOTE-024 se incluyeron pacientes con CPCNP metastásicos sin alteraciones en *EGFR* ni *ALK*, con buen estado general. Se aleatorizaron a recibir pembrolizumab 200 mg cada 3 semanas por 35 ciclos frente a QT basada en platino. La SLP fue superior con pembrolizumab que con QT (7,7 frente a 5,5 meses; respectivamente, HR 0,50, IC del 95% 0,39-0,65, así como la SG (26,3 frente a 13,4 meses; respectivamente, HR 0,62, IC del 95% 0,48-0,81). Además, la SG a 5 años fue del 32% versus 16 % con pembrolizumab (IC del 95% 24,5%-39,5%)] en comparación con la QT (IC del 95% 10,6%-23,0%)^{110,111}.

- Cemiplimab

En el estudio EMPOWER-Lung 1, se incluyeron pacientes con PD-L1 $\geq 50\%$ en células tumorales, y se comparó cemiplimab frente a QT de doblete de platino a elección del investigador. Cemiplimab, demostró ser superior a la QT con una mediana de SG en el grupo de cemiplimab de 26,1 meses frente a 13,3 meses en el grupo de la QT (HR 0,57, IC del 95%: 0,46–0,71; $p < 0,0001$)^{112,113}.

- Atezolizumab

El estudio IMpower110 evaluó la eficacia de atezolizumab en monoterapia frente a QT basada en platino en pacientes con CPCNP avanzado o metastásico que no tenían alteraciones en *EGFR* ni *ALK*. Se incluyeron pacientes con PD-L1 $\geq 1\%$ en CTs o en células inmunitarias y fueron aleatorizados a atezolizumab 1200 mg o QT de doblete de platino. La SG se evaluó jerárquicamente en subgrupos de expresión de PD-L1. En el subgrupo de pacientes con PD-L1 alto ($\geq 50\%$ CTs o $\geq 10\%$ en células inmunes), atezolizumab mostró una mejoría en la SG (20,2 meses vs frente a 14,7 meses con una HR 0,76, IC del 95% 0,54-1,09). Sin embargo, no se demostró beneficio en la SG para pacientes con PD-L1 alto/intermedio ($\geq 5\%$ en CTs o células inmunes)¹¹⁴.

Basado en los resultados de estos tres ensayos pivotaes, pembrolizumab, cemiplimab y atezolizumab recibieron aprobación de las agencias reguladoras para el tratamiento de primera línea en CPCNP metastásico, con PD-L1 $\geq 50\%$ en CTs (o $\geq 10\%$ en células inmunes para atezolizumab)

No se han realizado estudios comparativos entre las opciones de tratamiento de primera línea con anti-PD-(L)1, ya sea en combinación con QT o en monoterapia, aunque no se han encontrado diferencias importantes en términos de eficacia o seguridad en sus respectivos estudios pivotaes, por tanto la decisión del tratamiento vendrá condicionada por las características del propio paciente, las toxicidades de los fármacos y el comportamiento del tumor; en casos con una mayor cinética de crecimiento o alto volumen tumoral, la combinación es la opción más recomendada.

b) Segunda línea

La estrategia de tratamiento de segunda línea depende del tratamiento administrado en la primera línea.

En los casos, en que los pacientes no han recibido tratamiento con ICI de primera línea y han sido tratado con QT basada en un doblete de platino, en segunda línea se recomienda la monoterapia con anti-PD-(L)1. Tres agentes anti-PD-(L)1, nivolumab, pembrolizumab y atezolizumab, han sido aprobados por los organismos reguladores y son el tratamiento de elección para los pacientes con CPCNP avanzado previamente

tratado y que no han recibido inhibidores de PD-(L)1, independientemente de la expresión tumoral de PD-L1 (aunque pembrolizumab solo en PD-L1 $\geq 1\%$). Esta recomendación se basa en datos de estudios de fase III que demuestran un beneficio en SG y también en el perfil de toxicidades de estos fármacos en comparación con docetaxel en monoterapia^{115,116,117,118}.

En los pacientes con histología no escamosa que progresan rápidamente a la QT de primera línea, la combinación de nintedanib, un antiangiogénico, con docetaxel, ha demostrado un beneficio en supervivencia en comparación con docetaxel solo¹¹⁹.

En los pacientes que han recibido anti-PD-(L)1 en primera línea en monoterapia, se recomienda administrar un doblete de platino en segunda línea. En aquellos pacientes que han recibido la combinación de QT con ICIs, la monoterapia con docetaxel es la terapia de elección^{120,121}.

Tabla 6: Estudios fase III de segunda línea de tratamiento con anti-PD-(L)1 en CPCNP

Fármaco y estudio	Población	SLP	SG
KEYNOTE-010 ¹¹⁵ - Pembrolizumab 10 mg/kg/3 sem - Pembrolizumab 2 mg/kg/3 sem - Docetaxel 75 mg/m ² /3 sem	Escamoso y no escamoso PD-L1 $\geq 1\%$	4,0 vs. 3,9 vs. 4,0 meses (HR 0,79, 0,88)	12,7 vs. 10,4 vs. 8,5 meses (HR 0,61, 0,71)
CheckMate-017 ¹¹⁶ - Nivolumab 3 mg/kg/2 sem - Docetaxel 75 mg/m ² /3 sem	Escamoso PD-L1 independiente	3,5 vs. 2,6 meses (HR 0,61)	9,2 vs. 6 meses (HR 0,62)
CheckMate-057 ¹¹⁷ - Nivolumab 3 mg/kg/2 sem - Docetaxel 75 mg/m ² /3 sem	No escamoso PD-L1 independiente	2,3 vs. 4,2 meses (HR 0,90)	12,2 vs. 9,5 meses (HR 0,70)
OAK ¹¹⁸ - Atezolizumab 1200 mg/3 sem - Docetaxel 75 mg/m ² /3 sem	Escamoso y no escamoso PD-L1 independiente	2,8 vs. 4,0 meses (HR 0,93)	13,8 vs. 9,6 meses (HR 0,75)

Abreviaturas: SLP, supervivencia libre de progresión; SG, supervivencia global; HR, *hazard ratio*; mg, miligramos; kg, Kilogramos; m2, metros cuadrados; sem, semanas.

1.2.2.2 Factores predictivos de eficacia en el tratamiento con anti-PD-(L)1

En pacientes con CPCNP el bloqueo de PD-1 o PD-L1 ofrece beneficios en la tasa de control de la enfermedad y supervivencia. Sin embargo, una proporción de los pacientes tratados no experimenta ningún beneficio, pudiendo mostrar incluso hiperprogresiones (definidas como la ausencia de respuesta al tratamiento, con un crecimiento tumoral acelerado que provocan un impacto negativo en la sintomatología del paciente).

El desarrollo de biomarcadores potenciales es un elemento esencial de la estrategia terapéutica con ICIs. Existen biomarcadores propios del tejido tumoral, solubles y del propio huésped. Los biomarcadores del tejido pueden ser demasiado restrictivos, dada la heterogeneidad clonal y espacial del propio tumor o entre el tumor primario y las metástasis, y la heterogeneidad temporal que varía en las primeras etapas del CPCNP con respecto a las etapas avanzadas. Las biopsias iniciales proporcionan una visión incompleta de la evolución de los cambios en el tumor durante el tratamiento, por lo que analizar muestras de archivo puede llevar a una mala interpretación de los resultados. Además, en el CPCNP a veces no es fácil o accesible la recogida de muestras en las diferentes etapas de la enfermedad. Por otro lado, los biomarcadores circulantes o solubles pueden actuar como sustitutos de los mecanismos inmunitarios locales, lo que permite una evaluación más integral de la capacidad inmunitaria del huésped y pruebas dinámicas en el tiempo.

1.2.2.2.1 *Biomarcadores propios del tumor.*

Expresión tumoral de PD-L1

La expresión de PD-L1 en el tejido tumoral determinada por IHC, es el biomarcador más utilizado y el único aprobado hoy en día, aunque se sabe que es un biomarcador predictivo imperfecto.

Existen trabajos que relacionan la expresión de PD-L1 con el beneficio al tratamiento con fármacos anti-PD-(L)1 y varios estudios han llevado a aprobaciones por agencias regulatorias basadas en la expresión de PD-L1. Por ejemplo, el estudio KEYNOTE-024 demostró que aquellos pacientes CPCNP avanzado con una alta expresión de PD-

L1 ($\geq 50\%$) en células tumorales se beneficiaban más del tratamiento con pembrolizumab, en monoterapia que con QT basada en platino, en términos de SLP y SG¹¹⁰. Además, estudios han demostrado que a mayor expresión de PD-L1, mejores resultados con la monoterapia de anti-PD-1¹²².

Sin embargo, existen datos publicados contradictorios. Por ejemplo, en el estudio CheckMate-227, la baja o nula expresión de PD-L1 se correlacionó con un resultado favorable con el bloqueo conjunto de PD-L1 y CTLA-4¹²³.

Otros estudios con diferentes puntos de corte de expresión de PD-L1 han mostrado resultados negativos. Por ejemplo, con un punto de corte de expresión de PD-L1 de $> 5\%$ nivolumab no demostró con mejoría en SLP ni SG en pacientes tratados en primera línea de CPNCP con la monoterapia versus la QT basada en platino¹²⁴. Atezolizumab, en otro estudio demostró un menor beneficio en comparación con la QT en pacientes con expresión positiva de PD-L1 $< 50\%$ ¹²⁵.

Además, existen diferentes técnicas y anticuerpos para la evaluación de la expresión de PD-L1. Inicialmente, cada ensayo de IHC para la evaluación de PD-L1 fue desarrollado de manera independiente por cada laboratorio y para cada fármaco. Este hecho dificultaba la evaluación del estado de PD-L1 dado que cada ensayo podía mostrar propiedades de tinción distintas, lo que podía impedir la intercambiabilidad. Para resolver este hecho, se realizó el proyecto Blueprint 2 de PD-L1 que demostró que tres de los anticuerpos (22C3, 28-8 y SP263) ofrecían resultados intercambiables para evaluar la expresión de PD-L1 en CTs (en función del TPS)¹²⁶.

Por tanto, existen diferentes limitaciones asociadas a la determinación del PD-L1 como son la técnica utilizada para su determinación, el punto de corte, la heterogeneidad intratumoral, la variabilidad de su expresión entre el tumor primario y las metástasis, la expresión dinámica de PD-L1 en el tiempo y/o los cambios según los tratamientos.

Tumor mutacional burden

La carga mutacional tumoral (TMB, del inglés, *Tumor Mutational Burden*) se refiere al número de mutaciones somáticas presentes en el genoma del tumor, excluyendo las mutaciones germinales. Se cuantifica como el número total de errores en

la codificación de genes somáticos identificados, sustituciones de bases y errores de inserción o delección de genes por cada millón de bases.

Un meta-análisis exploró la relación entre la TMB y los resultados de pacientes tratados con inhibidores de PD-(L)1, revelando una correlación positiva entre la TMB y la eficacia de la inmunoterapia¹²⁷. Estudios recientes, han demostrado que la TMB de tejido puede ser un biomarcador predictivo para la monoterapia con pembrolizumab en pacientes con CPCNP avanzado/metastásico con puntuaciones de proporción tumoral de PD-L1 de $\geq 1\%$ ($p < 0,001$), con un corte de TMB de ≥ 175 mutaciones/exoma¹²⁸. La TMB también ha demostrado tener un valor predictivo con la combinación de QT inhibidores de PD-(L)1. Un estudio, demostró que los pacientes con TMB alta en el grupo de combinación de toripalimab con QT tenían una tasa de respuesta objetiva más alta en comparación con el grupo de QT sola, así como beneficio en SLP¹²⁹.

Sin embargo, existen también estudios con resultados no tan prometedores en cuanto al valor predictivo de la TMB, con resultados no reproducibles con tratamientos similares o puntos de corte similares. Por ejemplo, hay estudios que han evaluado la TMB alta como variable, en pacientes que recibieron pembrolizumab más QT y la TMB alta no se asoció con beneficio significativo^{130,131}.

Además, otros estudios utilizan la biopsia líquida y han mostrado una correlación positiva entre la TMB en sangre (bTMB) y la TMB^{132,133}. La bTMB ha demostrado ser un valor predictivo positivo para los pacientes de primera línea que reciben monoterapia de atezolizumab¹³⁴. La bTMB también se ha evaluado en pacientes tratados con ICI en combinación con QT. Un estudio demostró que los pacientes que recibían tremelimumab + durvalumab + QT tenían una mayor mediana de SG tanto en el subgrupo bTMB ≥ 20 mut/Mb como en el de < 20 mut/Mb, aunque el beneficio era mayor en el grupo bTMB alto¹³⁵. Sin embargo otros estudios que incluían pacientes con CPCNP avanzados tratados con anti-PD-(L)1, no han logrado corroborar este papel predictivo positivo de la bTMB^{136,137}.

Por tanto, el papel de la TMB, tanto en tejido como en sangre, en la predicción de la eficacia de los inhibidores de PD-(L)1 aún no se ha aclarado, ni tampoco su mejor punto de corte¹³⁸.

Mutaciones genéticas específicas

Las mutaciones accionables en los genes *EGFR* y *ALK*, entre otras, confieren resistencia a los ICIs¹³⁹.

Un análisis retrospectivo evaluó la respuesta a la terapia con ICI en pacientes con CPCNP metastásico que presentaban alteraciones en determinados genes, incluidas mutaciones en *KRAS*, *EGFR*, *BRAF*, *HER2*, *MET* y las translocaciones en *ALK*, *ROS1* y *RET*. En cuanto a la SLP a los 12 meses, los mejores resultados en la terapia con ICI se encontraron en pacientes con mutaciones en *KRAS* y *MET*; los pacientes con la mutación *HER2* presentaron un resultado intermedio, mientras que aquellos con mutaciones en *RET*, *EGFR*, *ALK* y *ROS1* presentaron los peores resultados de SLP a los 12 meses¹⁴⁰.

Otras mutaciones de genes no accionables, se ha descrito que también pueden conferir resistencia o beneficio al tratamiento con ICIs:

a) *STK11* y *KEAP1*

Varios estudios han propuesto que las mutaciones en *STK11* y *KEAP1* contribuyen a la resistencia a los inhibidores de PD-(L)1. Un estudio evaluó el impacto de las mutaciones en *STK11* y *KEAP1* en muestras de CPCNP y la respuesta a varios tratamientos, entre ellos, los inhibidores de PD-1/PD-L1. Se observó que un mayor porcentaje de las muestras con mutaciones en *STK11* y/o *KEAP1* tenían una tinción negativa de PD-L1, en contraste con las muestras “wild type”, así como una menor mediana de SLP.

En el estudio MYSTIC, las mutaciones de los genes *STK11* y *KEAP1* se asociaron con medianas de supervivencia menores en comparación con los pacientes sin alteraciones moleculares en las diferentes ramas de tratamiento¹⁴¹.

b) *SMARCA4*

Las mutaciones en *SMARCA4* parecen asociarse con mejores resultados. Pacientes con mutaciones en *SMARCA4* que fueron tratados con toripalimab, particularmente de histología no escamosa, presentaron una SLP significativamente mejor en el brazo de combinación con toripalimab en comparación con el brazo de QT sola¹²⁹.

c) *ARID1A*

También se han reportado efectos favorables en los resultados de los ICI para el CPCNP que presenta la mutación de *ARID1A*. En un análisis exploratorio del ensayo MYSTIC se evaluó la relación entre las alteraciones genéticas detectadas en el ADNc y los resultados del tratamiento con durvalumab más tremelimumab. Los casos que presentaban la mutación del gen *ARID1A* mostraron mayor SG con ICI¹⁴¹.

Un estudio retrospectivo con 3403 pacientes con diferentes tipos de tumores, incluido el CPCNP¹⁴² observó que las mutaciones de *ARID1A* se asociaban significativamente con la inestabilidad de microsatélites y un TMB alto. Su papel predictivo favorable sobre la SLP ocurrió independientemente del estado de microsatélites o del TMB.

d) Otros genes

Otros genes descritos como posibles predictores de eficacia de los ICI son la presencia de mutación en *POLE* y la ausencia de mutación en *PTEN*, el primero está involucrado en la replicación y reparación del ADN, y el segundo es un reconocido supresor tumoral que inhibe la vía *PI3K/mTOR/AKT*¹³⁹.

Inestabilidad de microsatélites. Deficiencia en los genes de reparación del ADN

Tanto la inestabilidad de microsatélites (MSI, del inglés, *Microsatellite Instability*) como las alteraciones en los genes de reparación del DNA (MMRD, del inglés, *Mismatch Repair Deficiency*) representan fenotipos hipermutadores¹⁴³. Los tumores con MSI y MMRD son altamente inmunogénicos y se han utilizado como biomarcadores predictivos para la eficacia de los ICI. Hay ensayos que han demostrado que el tratamiento con anti-PD-1 en esta población ofrece altas tasas de respuesta^{144,145}.

Biomarcadores relacionados con el microambiente tumoral

a) Infiltración tumoral de linfocitos T

Se ha demostrado que niveles altos de linfocitos T infiltrantes en el tumor tienen un papel pronóstico favorable¹³⁹. Un análisis reciente destacó que la abundancia de

linfocitos T CD8+ es el factor más predictivo de la respuesta a la terapia anti-PD-1/PD-L1 en 21 tipos de cáncer, incluido el CPCNP¹⁴⁶.

El papel de los linfocitos T CD4+ es más controvertido, ya que representan una población compleja, con características tanto de activación inmunitaria (linfocitos T helper 1, helper 2 o helper 17) como de supresión (células T reguladoras), lo que requiere marcadores adicionales para su completa identificación¹³⁹.

1.2.2.2.2 Factores propios del huésped

Células inmunitarias circulantes. Recuento absoluto y ratios

Las diferentes células inmunitarias, incluidos los linfocitos T, los linfocitos B, los monocitos y las células NK, se cuantifican fácilmente mediante un hemograma completo, prueba obligatoria al inicio del tratamiento y durante él.

La relación neutrófilo-linfocito (NLR, del inglés, *Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio*) y la relación neutrófilo-linfocito derivada (dNLR, del inglés, *Derived Neutrophil-Lymphocyte Ratio*), también se han investigado como biomarcadores. Un metaanálisis de 100 estudios, que incluyó a más de 40.000 pacientes, mostró que una NLR > 4 se asociaba con una peor SG, SLP y SLE en todos los tipos y estadios de cáncer¹⁴⁷. La NLR también se ha evaluado en el contexto del tratamiento con ICIs. En una cohorte prospectiva de 175 pacientes con CPCNP avanzado que recibieron nivolumab, una NLR $\geq$ 5 se asoció de forma independiente con una menor SLP y SG¹⁴⁸.

La dNLR se diferencia de la NLR porque tiene en cuenta al grupo de monocitos y otras poblaciones de granulocitos. Un puntaje elevado de dNLR antes del tratamiento (>3) también se ha asociado con una peor SG en grandes cohortes retrospectivas de pacientes con melanoma tratados con ipilimumab¹⁴⁹ y pacientes con CPCNP tratados con anti-PD-L1¹⁵⁰. Además, en aumento dNLR durante el tratamiento, se relaciona con peores resultados en peor SLP y SG¹⁵⁰.

El índice pronóstico inmunológico pulmonar (LIPI, del inglés, *Lung Immune Prognostic Index*) es una puntuación combinada que varía de 0 a 2, y se calcula asignando un punto a cada una de las siguientes determinaciones: dNLR previa al tratamiento >3 y LDH (Lactato Deshidrogenasa) superior al límite normal superior. El LIPI se ha

correlacionado con los resultados de los inhibidores de PD-(L)1 en un estudio retrospectivo de pacientes con CPCNP. La mediana de SG en el grupo de puntuación LIPI desfavorable, intermedia y buena fue de 3 meses (95%CI, 1 mes a NA), 10 meses (95%CI, 8 meses a NA) y 34 meses (95% CI 17 m a NA), respectivamente. Por contra, en un grupo de control de pacientes tratados con QT, el LIPI no se correlacionó con los resultados de QT, lo que sugiere que la puntuación LIPI podría servir como un biomarcador predictivo potencial del tratamiento con anti-PD-(L)1¹⁵¹. No obstante, este papel no ha sido confirmado posteriormente^{152,153}.

Por tanto, el límite entre el valor pronóstico o predictivo de la NLR y el LIPI en pacientes con CPCNP tratados con inhibidores de PD-(L)1 sigue sin estar claro.

Fenotipo leucocitario y plaquetario

La citometría de flujo permite identificar las diferentes subpoblaciones celulares mediante inmunofenotipificación.

La población de linfocitos T en sangre periférica es la más estudiada en los pacientes que son tratados con ICIs. Se ha demostrado que los linfocitos T con expresión positiva de PD-1 son más frecuentes en pacientes con CPCNP que en controles sanos^{154,155}. La expresión de PD-1 en los linfocitos T también se ha asociado con un peor pronóstico. En un estudio que incluyó a 42 pacientes con CPCNP, la SG y SLP fueron más cortas en pacientes con una alta expresión de linfocitos T CD4+ con expresión positiva de PD-1 en muestras de sangre antes del tratamiento¹⁵⁴.

Otro estudio evaluó los niveles de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en todas las células mononucleares de sangre periférica en 70 pacientes que fueron tratados con QT. La expresión PD-1 y PD-L1, se asoció con un mal pronóstico, en particular la expresión de PD-L1 en los linfocitos T CD8+ y la expresión de PD-1 en los linfocitos T CD4+¹⁵⁵.

Las plaquetas (PLTs) son también moduladores claves de la respuesta inmunitaria. Hay estudios que indican que las PLTs pueden aumentar la expresión de PD-L1 en condiciones de cáncer, lo que podría atenuar la respuesta inmunitaria antitumoral¹⁵⁶. Se ha demostrado que un aumento de la expresión de PD-L1 en las PLTs se correlaciona con un mayor beneficio clínico de la terapia anti-PD-L1 en pacientes con CPCNP¹⁵⁶.

Otra población estudiada son los monocitos, aunque la información sobre la relevancia en la predicción de la respuesta a los inhibidores de PD-(L)1 es controvertida. Por un lado, en pacientes con CPCNP¹⁵⁷, un mayor recuento absoluto de monocitos previo al inicio de los inhibidores de PD-(L)1 se ha correlacionado con una respuesta más rápida aunque sin correlación con mayor tasa de respuestas ni duración de las mismas¹⁵⁸. Por otro lado, la expresión de PD-L1 en monocitos circulantes se ha asociado con una SG más corta en pacientes tratados con anti-PD-1¹⁵⁹.

Con respecto a los neutrófilos, hay estudios que se han centrado en un subconjunto de neutrófilos de baja densidad circulantes con niveles más altos de PD-L1 y fenotipos maduros que median la inmunosupresión y pueden ser el objetivo de los inhibidores de PD-(L)1. Sin embargo se precisan más estudios que aclaren el papel de los neutrófilos en la respuesta a estas terapias¹⁶⁰.

En cuanto a los cambios que sufren estas poblaciones tras recibir el tratamiento con anti-PD-(L)1, existen también trabajos que los relacionan con el beneficio a estas terapias. Se ha observado en una cohorte pequeña de pacientes con CPCNP que un aumento en la proliferación de linfocitos T CD8+ PD-1+ en la sangre durante las cuatro semanas tras el inicio del tratamiento con anti-PD1 está asociado con mejores tasas de control de enfermedad¹⁶¹. También hay trabajos publicados en la misma línea que indican que el aumento de linfocitos T CD8+ PD-1+ en sangre periférica tras una semana de terapia anti-PD-1 se asociaba con mejores resultados en pacientes con CPCNP¹⁶². Aunque, existen estudios con resultados contradictorios, que relacionan los niveles altos de CD8+PD1+ con mal pronóstico en pacientes con CPCNP tratados con ICI^{163,164}.

PD-L1 Soluble

Recientes metaanálisis han reportado la existencia de niveles de PD-L1 soluble (sPD-L1) en la sangre en pacientes con varios tipos de cáncer, y que niveles altos de sPD-L1 predicen un mal pronóstico en pacientes con tumores sólidos^{164,165}.

En el CPCNP avanzado, los niveles plasmáticos de sPD-L1 no se correlacionan con los subtipos histológicos ni con el historial de tabaquismo¹⁶⁶, pero la expresión de sPD-L1 o sPD-L2 es significativamente más alta en comparación con controles sanos, y en algunos

estudios, una expresión de sPD-L1 elevada se correlaciona significativamente con un mal pronóstico^{155,166,167}.

Existe datos que indican que, en pacientes con CPCNP tratados con anti-PD-1, la tasa de control de enfermedad y de SG es superior en pacientes con niveles plasmáticos de sPD-L1 bajos en comparación pacientes con niveles altos¹⁶⁸.

También se ha reportado que la evolución dinámica de sPD-L1 se correlaciona con la eficacia del tratamiento. En una cohorte de 43 pacientes con CPCNP avanzado tratados con nivolumab, los niveles altos de sPD-L1 a dos meses tras el inicio de tratamiento, así como el aumento de las concentraciones de sPD-L1 durante el tratamiento, se asociaron con una mala respuesta y ausencia de beneficio clínico¹⁶⁹.

Aunque los niveles de sPD-L1 en suero y/o plasma podrían servir como biomarcadores, la técnica de medición y el punto de corte óptimos aún están por determinar, lo que limita su aplicación clínica.

Citocinas

Se han detectado concentraciones elevadas de algunas citocinas en pacientes con tumores¹³⁸. En el CPCNP, los niveles elevados de IL-2 a nivel basal, predicen la sensibilidad a ipilimumab, mientras que los niveles altos de IL-6 y TNF-alfa provocan la resistencia al mismo¹⁷⁰. Además, en pacientes con CPCNP, una baja concentración de IL-6 a nivel basal podría identificar pacientes con un mayor beneficio de los anti-PD-1¹⁷¹. También hay trabajos que han evaluado la evolución dinámica de la IL-8 durante el tratamiento con inhibidores de PD-1 en pacientes con CPCNP, observando un mayor beneficio entre los pacientes que presentaron una disminución temprana de los niveles de IL-8¹⁷², mientras que el aumento del factor de necrosis tumoral o del interferón-gamma durante el tratamiento con anti-PD-1s e correlacionó con una mejor respuesta y una mayor SG^{173,169}.

2. HIPOTESIS

La expresión tumoral de PD-L1 es, actualmente, el único biomarcador predictivo aprobado en el tratamiento del CPCNP con ICIs. Muchos estudios han demostrado una correlación positiva entre su expresión y la eficacia de la inmunoterapia. Sin embargo, la expresión de PD-L1 tumoral no siempre se correlaciona con la eficacia, ya que existen pacientes con alta expresión que no obtienen beneficio y, por el contrario, pacientes sin expresión tumoral de PD-L1 responden a estos tratamientos.

Existen además diferentes limitaciones asociadas a la determinación de PD-L1 en tumor, como son la técnica utilizada para su determinación, el punto de corte, la heterogeneidad intratumoral, la variabilidad de su expresión entre el tumor primario y las metástasis, la expresión dinámica de PD-L1 en el tiempo y/o los cambios según los tratamientos.

Por lo tanto, es fundamental identificar otros biomarcadores predictivos de respuesta en el tratamiento con ICI en pacientes con CPCNP que nos permitan identificar aquellos pacientes que pueden beneficiarse más del tratamiento de cara a evitar potenciales efectos secundarios del tratamiento, hiperprogresiones y sobrecostes económicos para el sistema sanitario.

Los biomarcadores basados en moléculas solubles y expresadas en células circulantes ofrecen ventajas frente a los tumorales dada su facilidad para la obtención de la muestra y que pueden ofrecer información dinámica. En los últimos años el tratamiento del CPCNP se basa en la administración de fármacos contra PD-(L)1 ya sea en combinación con QT o en monoterapia. Hay evidencia de que a parte de la expresión de PD-L1 tumoral, hay otras fuentes de PD-L1 como puede ser la que se asocia a células leucocitarias circulantes y a plaquetas.

Por esta razón planteamos la hipótesis de que los niveles de la expresión de PD-L1 en leucocitos y PLTs circulantes y el sPD-L1 basales o previos al inicio de tratamiento con fármacos anti-PD-(L)1 podrían correlacionarse con la eficacia del tratamiento, en términos de SG, SLP y tasa de respuestas, de manera que nos permitiera identificar mejor el subgrupo de pacientes que podría obtener un mayor beneficio.

También planteamos la hipótesis de que tras el inicio del tratamiento con anti-PD(L)1, se producen cambios en la expresión de PD-L1 en los leucocitos y PLTs circulantes y de citocinas que pueden también ayudar a identificar aquellos pacientes que presentarán una mejor respuesta al tratamiento.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Principal

Analizar el papel de las diferentes fuentes de expresión de PD-L1, tanto en el tumor como en circulantes en la forma de molécula plasmática soluble o expresada en la superficie de leucocitos circulantes, PLTs o PMPs (del inglés, *Platelet Microparticles*), como potenciales biomarcadores de eficacia del tratamiento con anti-PD-(L)1 en pacientes con CPCNP avanzado.

3.2 Objetivos Secundarios

- Correlacionar la expresión de PD-L1 en linfocitos, monocitos, neutrófilos, PLTs, micropartículas plaquetarias y niveles plasmáticos de sPD-L1, en pacientes con CPCNP avanzado, previos al inicio de tratamiento con inhibidores de PD-(L)1 con los resultados de SLP y SG.
- Correlacionar la expresión basal de PD-L1 en linfocitos, monocitos, neutrófilos, PLTs, y niveles plasmáticos de PD-L1 soluble con la respuesta radiológica de los pacientes con CPCNP avanzado tratados con anti-PD-(L)1.
- Evaluar los cambios en la expresión de PD-L1 de población leucocitaria y PLTs, durante el tratamiento con anti-PD-(L)1 en pacientes con CPCNP avanzado y su relación con la respuesta radiológica.
- Explorar la asociación de cambios en la concentración de los inmunomoduladores solubles en plasma (citocinas) en los pacientes con CPCNP avanzado tratados con anti-PD-(L)1 con la respuesta al tratamiento.

4. COMPENDIO DE PUBLICACIONES

4.1 La integración de PD-L1 sistémico y tumoral como biomarcador predictivo de los resultados clínicos en pacientes con CPCNP avanzado tratados con inhibidores de PD-(L)1.

En este apartado se incluye la publicación descrita a continuación:

Título:

The integration of systemic and tumor PD-L1 as a predictive biomarker of clinical outcomes in patients with advanced NSCLC treated with PD-(L)1blockade agents

Cancer Immunology, Immunotherapy (2022) 71:1823–1835

<https://doi.org/10.1007/s00262-021-03107-y>

PMID: 34984538

Autores:

Carlos Zamora Atenza*, Geòrgia Anguera*, Mariona Riudavets Melià, Letícia Alserawan De Lamo, Ivana Sullivan, Andrés Barba Joaquin, Jorgina Serra Lopez, M. Angels Ortiz, Maria Mulet, Sílvia Vidal, Margarita Majem.

* co-primeros autores

Departamento de Oncología Médica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y
Departamento de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.



The integration of systemic and tumor PD-L1 as a predictive biomarker of clinical outcomes in patients with advanced NSCLC treated with PD-(L)1 blockade agents

Carlos Zamora Atenza¹ · Geòrgia Anguera^{2,3} · Mariona Riudavets Melià^{2,4} · Letícia Alserawan De Lamo⁵ · Ivana Sullivan² · Andrés Barba Joaquin² · Jorgina Serra Lopez² · M. Angels Ortiz¹ · Maria Mulet¹ · Sílvia Vidal¹ · Margarita Majem²

Received: 31 May 2021 / Accepted: 5 November 2021 / Published online: 5 January 2022
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

Background Tumor PD-L1 expression is a predictive biomarker for patients with NSCLC receiving PD-(L)1 blockade agents. However, although increased tumor PD-L1 expression predicts responsiveness, clinical benefit has been observed regardless of tumor PD-L1 expression, suggesting the existence of other PD-L1 sources. The aim of our study was to analyze whether integrating systemic and tumor PD-L1 is more predictive of efficacy in patients with advanced NSCLC receiving PD-(L)1 blockade agents.

Material and methods Twenty-nine healthy donors and 119 consecutive patients with advanced NSCLC treated with PD-(L)1 drug were prospectively included. Pretreatment blood samples were collected to evaluate PD-L1 levels on circulating immune cells, platelets (PLTs), platelet microparticles (PMPs), and the plasma soluble PD-L1 concentration (sPD-L1). Tumor PD-L1 status was assessed by immunohistochemistry. The percentages of circulating PD-L1 + leukocytes, sPD-L1 levels, and tumor PD-L1 were correlated with efficacy.

Results No differences in the percentages of circulating PD-L1 + leukocytes were observed according to tumor PD-L1 expression. Significantly longer progression-free survival was observed in patients with higher percentages of PD-L1 + CD14+, PD-L1 + neutrophils, PD-L1 + PLTs, and PD-L1 + PMPs and significantly longer overall survival was observed in patients with higher percentages of PD-L1 + CD14+ and high tumor PD-L1 expression. Integrating the PD-L1 data of circulating and tumor PD-L1 results significantly stratified patients according to the efficacy of PD-(L)1 blockade agents.

Conclusions Our results suggest that integrating circulating PD-L1 + leukocytes, PLT, PMPs, and sPD-L1 and tumor PD-L1 expression may be helpful to decide on the best treatment strategy in patients with advanced NSCLC who are candidates for PD-(L)1 blockade agents.

Keywords Immunotherapy · NSCLC · Systemic PD-L1 · Soluble PD-L1 · Predictive biomarker

Abbreviations

CH	Chemotherapy	HD	Healthy donors
CI	Confidence interval	HR	Hazard Ratio
ECOG PS	Eastern Cooperative Oncology Group performance status	IO	Immunotherapy
FITC	Fluorescein	IPD	Integrated PD-L1 data
		irAEs	Immune-related adverse events
		IHC	Immunohistochemistry
		iRECIST	Immune-Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
		NSCLC	Non-small cell lung cancer
		PD-1	Programmed death-1
		PD-L1	Programmed death-ligand 1
		PLTs	Platelets
		PMPs	Platelet microparticles
		sPD-L1	Plasma concentrations of soluble PD-L1

Carlos Zamora Atenza and Geòrgia Anguera have contributed equally to this work. Sílvia Vidal and Margarita Majem Tarruella have contributed equally to this work.

✉ Margarita Majem
 mmajem@santpau.cat

Extended author information available on the last page of the article

OS	Overall survival
PFS	Progression-free-survival
TPS	Tumor proportion score
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
NE	Not evaluable
PE	Phycoerythrin
PECy7	Phycoerythrin Cyanine 7
PECy5	Phycoerythrin Cyanine 5

Introduction

Programmed death-1 (PD-1) or programmed death-ligand 1 (PD-L1) blockade agents have improved treatment outcomes in advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC), either as monotherapy or in combination with chemotherapy and/or other immune-checkpoint blockade agents [1]. However, up to 60% of patients with advanced NSCLC will not benefit from PD-(L)1 blockade agents [1]. Moreover, around 11–30% of patients develop serious immune-related adverse events (irAEs) [2]. For those reasons, and given the high cost of those treatments, the development of predictive biomarkers to accurately select patients remains an ongoing challenge.

To date, tumor PD-L1 expression by immunohistochemistry (IHC) is the only approved predictive biomarker for PD-(L)1 blockade agents in advanced NSCLC. Several studies have demonstrated an improvement in overall survival (OS) in patients with previously untreated advanced NSCLC with a PD-L1 tumor proportion score (TPS) of 50% or greater [3, 4]. Nevertheless, tumor PD-L1 expression does not always correlate with efficacy in pretreated NSCLC patients and several trials have shown a survival benefit of PD-(L)1 blockade agents regardless of PD-L1 expression levels [5]. Additionally, tumor PD-L1 expression has other limitations: heterogeneous intra-tumor expression variability, variability between metastatic sites and the primary tumor, sampling methodology (biopsy or cytology), and dynamic tumor PD-L1 expression [6, 7]. This last limitation may be significant when archival samples from pretreated patients collected months or years before starting PD-(L)1 inhibitor are used. It is known that chemotherapy can upregulate PD-L1 expression, not reflecting tumor PD-L1 expression in archival samples [6, 8]. Finally, another very important concern is that tumor biopsies for PD-L1 testing may not always be available.

Retrospective studies of response to PD-(L)1 blockade agents have provided new evidence of possible circulating immunological biomarkers [9]. Different innate and adaptive immune cells are involved in cancer immune surveillance, which can potentially determine their efficacy [10]. The analysis of circulating immune cells also has the advantage of being permanently available and easy to obtain. Moreover,

it can be used for the real-time monitoring of treatment response. The fact that patients with advanced NSCLC with negative tumor PD-L1 expression may also benefit from PD-(L)1 blockade agents suggests that response may be mediated by other relevant sources of PD-L1, such as immune-related blood markers. In patients with advanced NSCLC, PD-L1 can be constitutively expressed on the surface of different immune cells [11–13]. In patients with head and neck carcinoma, expression of PD-L1 was also found in platelets [14]. Although little is known regarding the relevance of systemic PD-L1 + cells as a predictor biomarker for PD-(L)1 blockade agents, a role for PD-L1 + myeloid cells in clinical responses to PD-(L)1 blockade agents in advanced NSCLC has been described [13]. Therefore, the expression of PD-L1 on immune cells, which can also compromise the immune response against the tumor, is probably underestimated. In addition, PD-L1 can also be detected as a soluble protein in plasma [11, 12, 15]. Recent evidence have demonstrated that soluble PD-L1 (sPD-L1) derives from malignant cells through different mechanisms: secreting sPD-L1 by alternative splicing [16]; shedding PD-L1 by tumor surface proteases [17] and generation of extracellular vesicles carrying PD-L1 [18, 19]. Current evidence indicated that sPD-L1 has the capacity to compromise anti-tumor response and sPD-L1 is a predictor for patients with cancer that received PD-(L)1 blockade agents [15, 16, 20, 21]. We hypothesized that the integration of pretreatment systemic and tumor PD-L1 expression may prove to be a better predictor of clinical outcomes in patients with advanced NSCLC receiving PD-(L)1 blockade agents. Therefore, the aim of our study was to analyze the role of systemic PD-L1 from different sources as a potential immune-related blood biomarker in patients with advanced NSCLC treated with PD-(L)1 inhibitors.

Material and methods

Patient population

This was a prospective, single-center observational, non-interventional study. We included 29 healthy donors (HD) and 119 consecutive patients with histologically or cytologically confirmed advanced NSCLC treated at our institution with PD-(L)1 blockade agents alone ($N=104$) or in combination ($n=15$), irrespective of treatment line, from May 2015 to September 2019. The end of follow-up was June 2020. Treatment was discontinued until disease progression by Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) or Immune-Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (iRECIST), treatment completion, or unacceptable toxic effects. Treatment could be continued beyond disease progression if a clinical benefit was maintained.

Written informed consent was obtained from each patient and ethical approval for the study was granted by the Institutional Ethics Committee. Patient data were collected from electronical medical records.

OS was defined as the time between the first dose of PD-(L)1 blockade agent and death from any cause. Progression-free-survival (PFS) was defined as the time from the first dose of the PD-(L)1 blockade agent to radiological progression assessed by local investigators according to iRECIST and RECIST version 1.1. The PFS of five patients was not included since their progression was not evaluable.

Sample collection and whole blood staining

Whole blood samples from HD and patients with advanced NSCLC were collected in heparinized BD Vacutainer tubes (BD, Franklin Lakes, NJ) before starting anti-PD-(L)1 therapy. One-hundred microliters (μL) of whole blood were incubated with anti-CD3-PECy7 (clone HIT3a), anti-CD8-PeCy5 (clone SK1), anti-PD-L1-PE (clone 29E.2A3) (Biolegend, San Diego, USA), anti-CD41a-FITC (clone HIP8) (Immunotools, Friesoythe, Germany), and anti-CD14-PECy7 (clone M5E2) (BD) monoclonal antibodies. Additionally, fluorescence minus one (FMO) controls were prepared for each cell marker to define negative gates. Then, red blood cells were lysed and white cells fixed using BD FACS lysing solution (BD Bioscience), washed with two milliliters (mL) of PBS 1X, and resuspended in 400 μL of PBS 1X to be analyzed by flow cytometry.

Flow cytometry analysis

Lymphocytes were gated according to Forward scatter (FSC) and Side scatter (SSC). CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes were identified on gated lymphocytes as CD3⁺CD8⁻ and CD3⁺CD8⁺ respectively. CD8⁺NK cell subset was identified on gated lymphocytes as CD3⁻CD8⁺ [22, 23]. Monocytes were gated according to CD14 expression (CD14⁺) and SSC. Neutrophils were gated as SSC high CD14⁻ cells. To analyze platelets (PLTs) and remainder platelet micro-particles (PMPs) in blood after centrifugation, samples were acquired using FSC and SSC on logarithmic scale. Blood PLTs ($> 1 \mu\text{m}$) and PMPs ($< 1 \mu\text{m}$) were identified as CD41a⁺ events in corresponding gate regions previously established using a blend of size-calibrated fluorescent beads with sizes ranging from 0.22 to 1.35 μm (Spherotech, IL, USA). Samples were acquired with the MACSQuant Analyzer 10 flow cytometer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The percentage of PD-L1 positive cells (PD-L1⁺) according to FMO controls and event/ μL for each population was obtained using FlowJo version X (FlowJo LLC, Ashland, USA).

The percentage of PD-L1 + immune cells was analyzed in all patients and the percentage of PD-L1 + PLTs and PMPs was analyzed in 76 patients. To determine patients with high or low percentages of PD-L1 + CD4⁺, PD-L1 + CD8⁺, PD-L1 + CD8⁺NK, PD-L1 + CD14⁺, PD-L1 + Neutrophils, PD-L1 + PLTs, and PD-L1 + PMPs, we calculated confidence interval (CI) cut-offs of 95% of HD values. These cut-offs excluded 95% of HD values in a normal distribution. Statistically, a CI of 95% is equal to the mean plus 1.96 standard deviations.

Determination of soluble PD-L1

Plasma concentrations of sPD-L1 were determined using a specific ELISA kit (Invitrogen, California, USA) according to the manufacturers' instructions and using the specific standard curves of recombinant molecules. The 95% CI of HD values was calculated to identify patients with high and low levels of sPD-L1. sPD-L1 was determined in 118 patients. The lower limit of detection was 4.69 pg/mL.

Tumor PD-L1 expression

PD-L1 status was assessed on tumor cells by immunohistochemistry using the anti-PD-L1 antibody clone 22C3 (pharmDxDakokit) as per local practice. The expression of PD-L1 by TPS (Tumor Proportion Score) was valid when evaluated in more than 100 cells and categorized as negative ($< 1\%$), low PD-L1 expression (1–49%), and high expression ($\geq 50\%$), which are the standard cutoffs for clinical use. Tumor PD-L1 expression was determined in 102 patients.

Radiological assessment

Radiological evaluation was determined by investigators according to RECIST version 1.1 and iRECIST, at baseline and approximately every three months (in line with clinical practice) or whenever the physician deemed it necessary.

Statistical analysis

The Kolmogorov–Smirnov test was used to analyze the normal distribution of data. To describe our population, numbers and percentages were used for qualitative variables, while the median (interquartile ranges, IQR) was calculated for ordinal and quantitative variables with asymmetric distribution. Comparisons between groups were tested with the Student's *t* or the Mann–Whitney test, according to a Gaussian distribution. ANOVA and Kruskal–Wallis tests were used for comparisons between more than two groups. Correlation analyses were carried out with Pearson's or Spearman correlations. The Kaplan–Meier method, along with the long-rank Mantel–Cox test, was used to analyze differences

in PFS and OS during the follow-up period. Univariate and multivariate (forward stepwise) Cox regression models were performed to calculate the hazard ratio (HR), the CI of 95%, and to evaluate the predictive impact of systemic and local PD-L1 expression in OS and PFS. A Receiver Operating Characteristic (ROC) curve was performed to establish the optimal cut-off point for integrated PD-L1 data in order to discriminate patients with progressive vs non-progressive disease.

All *p* values were based on a 2-sided hypothesis, and those under 0.05 were considered statistically significant. Analyses were performed using Graph Pad Prism 7 software except Cox regression model analysis, which was performed using the SPSS statistical software package (version 22, SPSS, Inc Chicago, Illinois, USA).

Results

Patient characteristics

Patient characteristics are shown in Table 1.

Median age was 65 years [IQR 36–84], 78.1% of patients were male and 21.9% were female. Most patients were current or former smokers (90.8%) and baseline Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status (PS) was 0–1 in 85.7% of patients. The most common histology was non-squamous (61.3%). PD-L1 expression was < 1% in 30 patients (25.2%), 1–49 in 35 (29.4%), ≥ 50% in 37 (31.1%) and not evaluable in 17 (14.3%). Thirty-seven patients (31.1%) received PD-(L)1 blockade agents as first-line treatment and 82 (68.9%) as second-line or beyond. PD-(L)1 blockade agents were administered alone in 104 patients (87.4%), in combination with chemotherapy in 11 patients (9.2%), and in combination with other immunotherapy agents in four patients (3.4%).

Median follow-up was 10.97 months [IQR: 6.06–21.87]. At the data cut-off on June 2020, a total of 24 patients were still receiving immunotherapy. The most common reasons for permanent discontinuation of treatment were progressive disease (68 patients), toxicity (10 patients), and treatment completion (6 patients).

Percentages of circulating PD-L1 + subpopulations of leukocytes, PD-L1 + PLTs and PMPs, and plasma sPD-L1 levels were independent of tumor PD-L1 expression

Higher percentages of circulating PD-L1 + leukocytes (CD4 + and CD8 + T lymphocytes, CD8 + NK cells, CD14 + and neutrophils) and PD-L1 + PLTs and PMPs were found in patients with advanced NSCLC compared to HD (Fig. 1A and B). Higher plasma sPD-L1 levels were also

Table 1 Baseline characteristics of patients with NSCLC

	N = 119 (%)
Median Age (range)	65 (36–84)
Sex	
Male	93 (78.1)
Female	26 (21.9)
Smoking habit	
Non-smoker	11 (9.2)
Smoker	34 (28.6)
Former smoker	74 (62.2)
ECOG PS	
0	15 (12.6)
1	87 (73.1)
2	17 (14.3)
Histology	
Squamous	46 (38.7)
Non-squamous	73 (61.3)
PD-L1 TPS	
< 1%	30 (25.2)
1–49%	35 (29.4)
≥ 50%	37 (31.1)
NE	17 (14.3)
Treatment line	
First Line	37 (31.1)
Second Line	64 (53.8)
Third Line or beyond	18 (15.1)
Treatment	
Combination IO-IO	4 (3.4)
Combination IO-CT	11 (9.2)
Monotherapy	104 (87.4)
Drug	
Anti-PD-1	91 (76.5)
Anti-PD-L1	28 (23.5)

TPS tumor proportion score, NE not evaluable, IO immunotherapy, CT chemotherapy, ECOG PS Eastern Cooperative Oncology Group performance status

found in patients with NSCLC (Fig. 1c). We did not observe differences in the percentages of circulating PD-L1 + subpopulations when we segregated patients with NSCLC according to tumor PD-L1 expression (Fig. 2), suggesting that systemic and tumor PD-L1 expression are independent variables in patients with NSCLC.

The percentages of PD-L1 + CD4 + and CD8 + T lymphocytes correlated with the percentage of PD-L1 + CD8 + NK cells. In addition, there was a significant correlation between PD-L1 + CD14 + and PD-L1 + neutrophils and between PD-L1 + PLTs and PD-L1 + PMPs. We observed a weak correlation between PD-L1 + lymphoid cells, PD-L1 + myeloid cells, and PD-L1 + PLTs and PMPs (Supplementary Table 1).

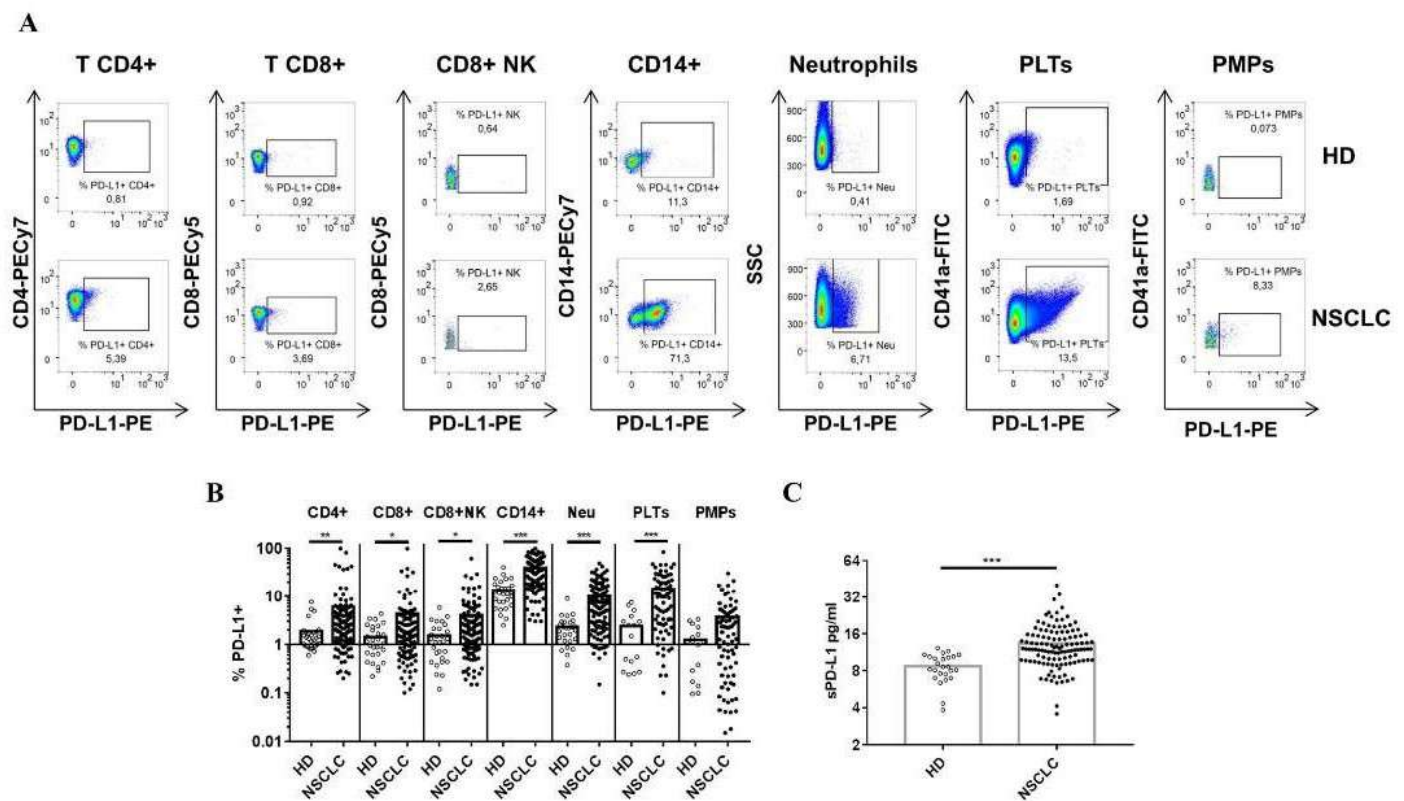


Fig. 1 Percentage of baseline circulating PD-L1+leukocytes, PD-L1+PLTs and PMPs and plasma sPD-L1 levels in patients with advanced NSCLC and HD prior to PD-(L)1 therapy. **a** Representative image of PD-L1 expression (PD-L1+) on circulating CD4+ and CD8+ T lymphocytes, CD8+ NK cells, CD14+ monocytes, Neutrophils, platelets (PLTs), and platelets microparticles (PMPs) from

HD and patients with NSCLC. **b** Dot plots show the percentage of circulating PD-L1+ leukocytes subpopulations (HD and 119 patients with NSCLC), PLTs and PMPs (HD and 76 patients with NSCLC), and **c** plasma soluble PD-L1 (sPD-L1) levels (HD and 118 NSCLC patients). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$

No differences in the percentages of PD-L1 + CD8 + T lymphocytes, CD8 + NK cells, CD14 +, neutrophils, PLTs, and PMPs were observed according to gender, smoking status, time from diagnosis, histology, treatment line, or ECOG PS. However, higher percentages of PD-L1 + CD4 + were observed in females and in patients with two or more previous treatments. We also observed higher plasma sPD-L1 levels in females and in patients with a high PD-L1 tumor expression and no previous treatment (Supplementary Table 2).

Patients with high percentages of PD-L1 + CD14 +, PD-L1 + neutrophils, PD-L1 + PLTs, and PD-L1 + PMPs had longer progression-free survival

We compared the median PFS of patients with NSCLC treated with PD-(L)1 blockade agents according to high or low percentages of PD-L1 + leukocytes, PLTs, PMPs, sPD-L1 levels, and tumor PD-L1 expression (< 1% TPS, 1–49% TPS and $\geq 50\%$ of TPS). The cut-off obtained for each variable was 5.05% for PD-L1 + CD4 +, 3.53% for PD-L1 + CD8 +, 4.11% for PD-L1 + CD8 + NK, 30.92% for PD-L1 + CD14 +, 5.73% for PD-L1 + Neutrophils, 7.05% for

PD-L1 + PLTs, 3.43% for PD-L1 + PMPs and 12.94 pg/ml for plasma sPD-L1. High or low PD-L1 percentage cut-off was not influenced by the cells/ μ l of each leukocyte population, PLTs, or PMPs (data not shown).

No differences in median PFS were observed between patients with high or low percentages of PD-L1 + CD4 +, PD-L1 + CD8 +, PD-L1 + CD8 + NK, and sPD-L1 level groups or according to tumor PD-L1 expression. However, median PFS was longer in patients with high percentages of PD-L1 + CD14 +, PD-L1 + neutrophils, PD-L1 + PLTs, and PD-L1 + PMPs groups (Fig. 3). Similar results were observed in patients with advanced NSCLC treated with PD-(L)1 inhibitor alone (data not shown).

Patients with a high percentage of PD-L1 + CD14 + and high tumor PD-L1 expression had longer overall survival

We also compared the median OS of patients with NSCLC treated with PD-(L)1 blockade agents according to high or low PD-L1 + leukocytes, PLTs and PMPs percentage, sPD-L1 levels, and tumor PD-L1 expression (< 1% TPS, 1–49% TPS and $\geq 50\%$ of TPS). No differences in median OS were

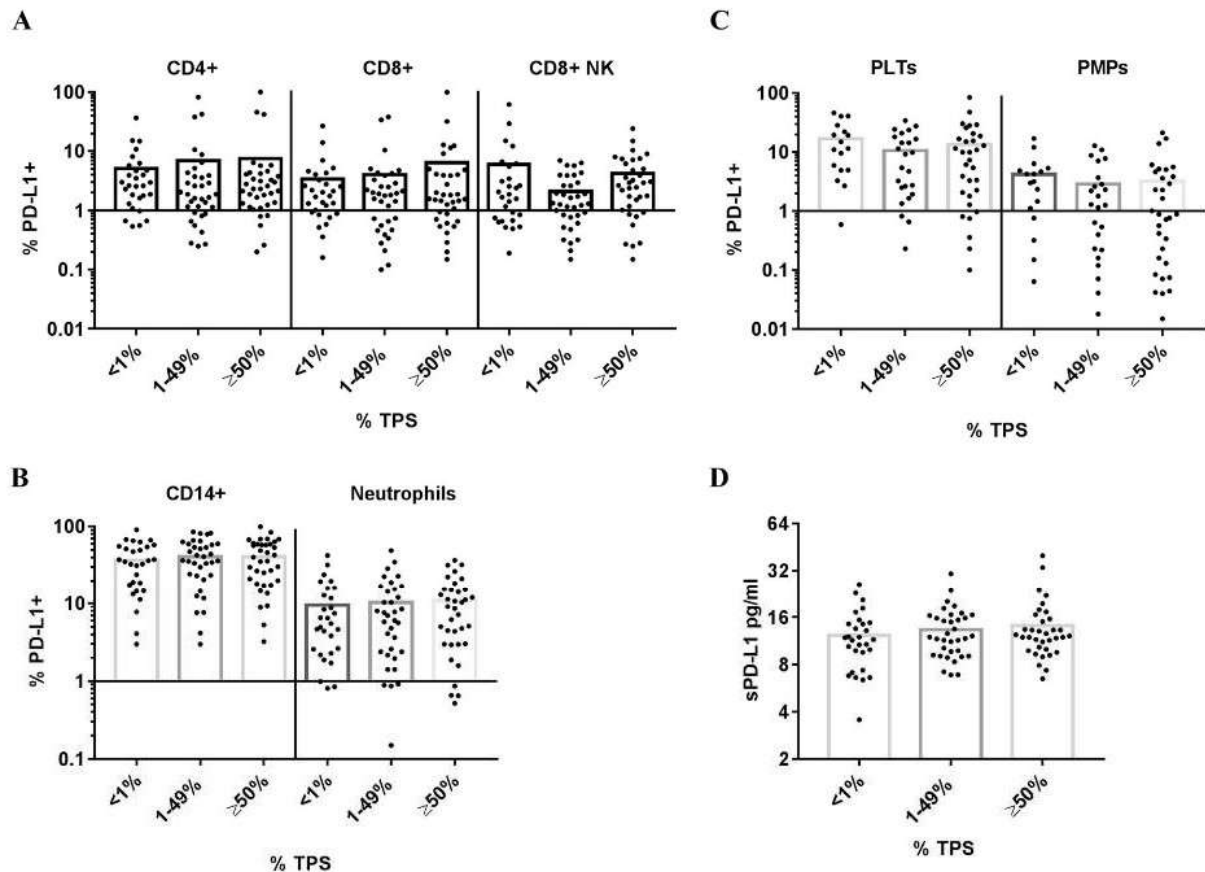


Fig. 2 Percentage of circulating PD-L1+ leukocytes, PD-L1+ PLTs and PMPs, and plasma sPD-L1 levels according to tumor PD-L1 expression. Dot plots show percentage of **a** PDL1+CD4+, PD-L1+CD8+ and PD-L1+CD8+NK cells (102 patients with NSCLC), **b** PD-L1+CD14+ and PD-L1+Neutrophils (102 patients

with NSCLC), **c** Platelets (PLTs) and platelets microparticles (PMPs) (73 patients with NSCLC) and **d** plasma soluble PD-L1 (sPD-L1) (101 patients with NSCLC) according to PD-L1 tumor expression (TPS: tumor proportion score)

observed between patients with high or low percentages of PD-L1+CD4+, PD-L1+CD8+, PD-L1+CD8+NK cells, and PD-L1+PLTs or sPD-L1 level.

On the contrary, an increased median OS was observed in the group of patients with a high PD-L1+CD14+ percentage and high tumor PD-L1 expression, and a trend to longer OS was observed in the group of patients with high PD-L1+neutrophils and PD-L1+PMPs percentages (Figure 4). Again, similar results were observed in patients with NSCLC treated with PD-(L)1 inhibitor alone (data not shown).

Integration of circulating and tumor PD-L1 data predicts outcome with PD-(L)1 therapy

A univariate Cox regression model was performed to determine the effect of different PD-L1 sources on PFS and OS. High percentages of PD-L1+CD14+, PD-L1+neutrophil, and PD-L1+PMPs were predictors of PFS in patients with advanced NSCLC receiving immunotherapy. In a

multivariate Cox regression model, high percentages of PD-L1+CD14+ and PD-L1+PMPs were two independent variables to predict PFS (Table 2). Additionally, high percentages of PD-L1+CD14+, PD-L1+neutrophil and high tumor PD-L1 expression were predictors of OS in the univariate Cox regression, while high percentages of PD-L1+CD14+ and high tumor PD-L1 expression were independent variables to predict OS using the multivariate Cox regression model (Table 2).

We next investigated the integration of circulating and tumor PD-L1 data to predict clinical outcomes in patients receiving PD-(L)1 blockade agents, which was named integrated PD-L1 data (IPD). First, we performed an analysis on 70 patients with all the circulating and tumor PD-L1 data through a ROC curve comparing patients with progressive versus non-progressive disease to PD-(L)1 blockade agents to generate a cut-off point. AUC was 0.8 and the cut-off point was 154.1. We found that patients with IPD ≥ 154.1 had longer median PFS than those with IPD < 154.1 : median PFS not reached (NR) (95% CI not achieved) vs 4.33 months (95% CI: 3.25–5.41), (HR 0.29; 95% CI:

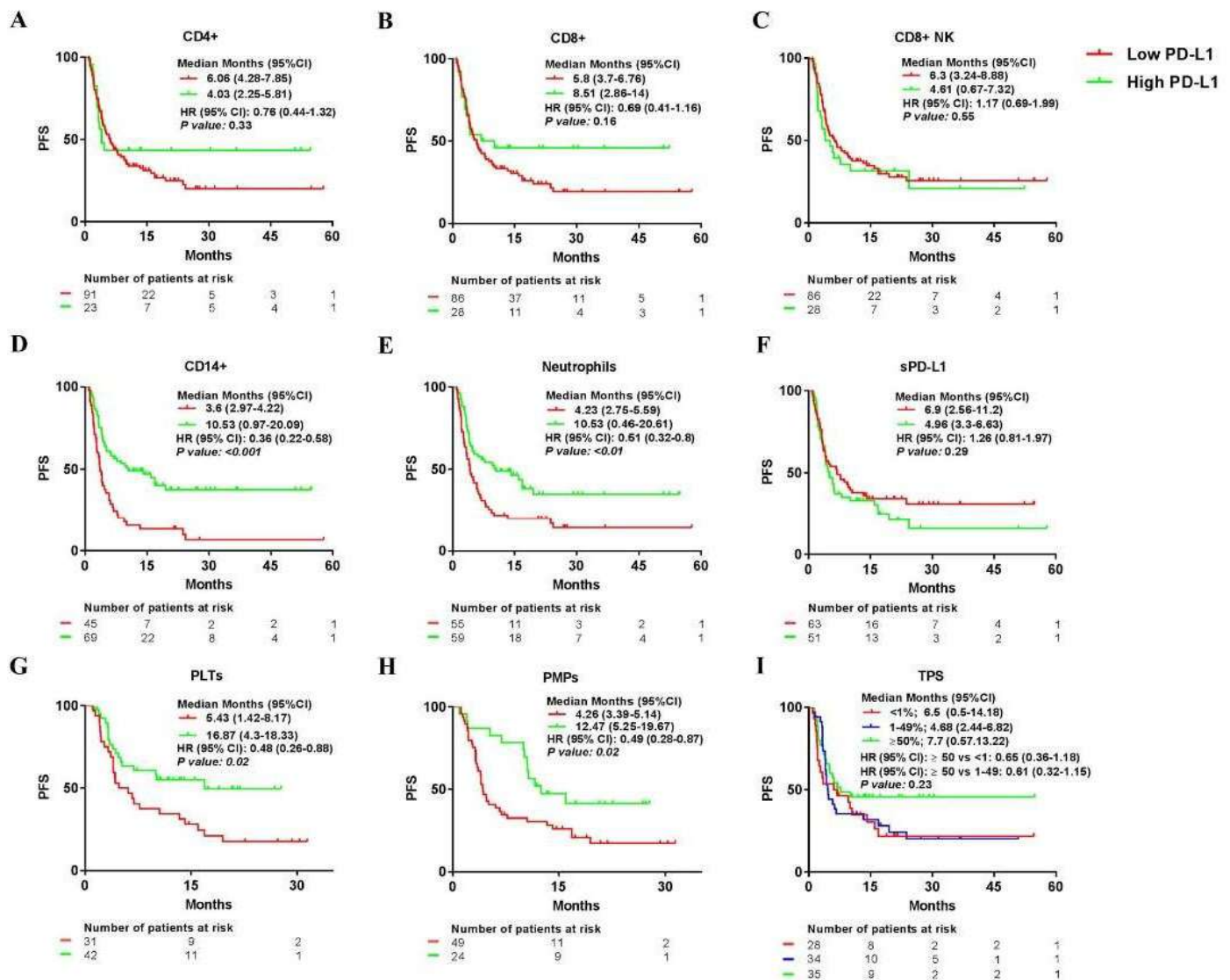


Fig. 3 Median progression-free survival comparing high and low percentage of PD-L1+leukocytes, PD-L1+PLTs and PMPs, plasma sPD-L1 levels, and tumor PD-L1 expression. Median progression-free survival (PFS) according to high or low group of **a**

PD-L1+CD4+, **b** PD-L1+CD8+, **c** PD-L1+CD8+NK cells, **d** PD-L1+CD14+, **e** PD-L1+Neutrophils, **f** pg/ml of sPD-L1, **g** PD-L1+PLTs and **h** PD-L1+PMPs. **i** tumor proportion score (TPS)

0.16–0.54, $p < 0.0001$). Similarly, median OS was longer in patients with IPD ≥ 154.1 : median OS NR (95% CI not achieved) vs 11.6 months (95% CI: 5.8–17.39), (HR 0.28; 95% CI: 0.14–0.54, $p = 0.0002$) (Fig. 5a–c). We then analyzed the combination of PD-L1 + CD14+ and high tumor PD-L1 expression, since they were independent variables for predicting OS in the multivariate analysis (the cut-off point was 83.85 as calculated by the ROC curve). We found that patients with IPD ≥ 83.85 had longer median PFS than those with IPD < 83.85 : median PFS NR (95% CI not achieved) vs 4.27 months (95% CI: 1.49–7.06), (HR 0.41; 95% CI: 0.23–0.75, $p = 0.0041$). Patients with IPD ≥ 83.85 also had longer median OS: median OS NR (95% CI not achieved) vs 11.44 months (95% CI: 3.41–19.46), (HR 0.32; 95% CI: 0.17–0.62, $p = 0.0041$) (Fig. 5d–f). Finally, we analyzed the

capability of IPD from all circulating PD-L1 sources to predict PFS and OS (the cut-off point was 105 as calculated by the ROC curve). We found that patients with IPD ≥ 105 had longer median PFS than those with IPD < 105 : median PFS NR (95% CI not achieved) vs four months (95% CI: 2.73–5.26), (HR 0.21; 95% CI: 0.11–0.4, $p < 0.0001$). A longer median OS was also observed in patients with IPD ≥ 105 : median OS NR (95% CI not achieved) vs 9.23 months (95% CI: 4.18–14.28), (HR 0.38; 95% CI: 0.2–0.73, $p = 0.0041$) (Fig. 5g–i). Multivariate analysis for PFS and OS including clinical variables such ECOG PS, histology, or line of therapy along with all the circulating and tumor PD-L1 data was also performed. We found that high PD-L1 + CD14+ percentage was the strongest variable followed by ECOG PS for survival outcomes.

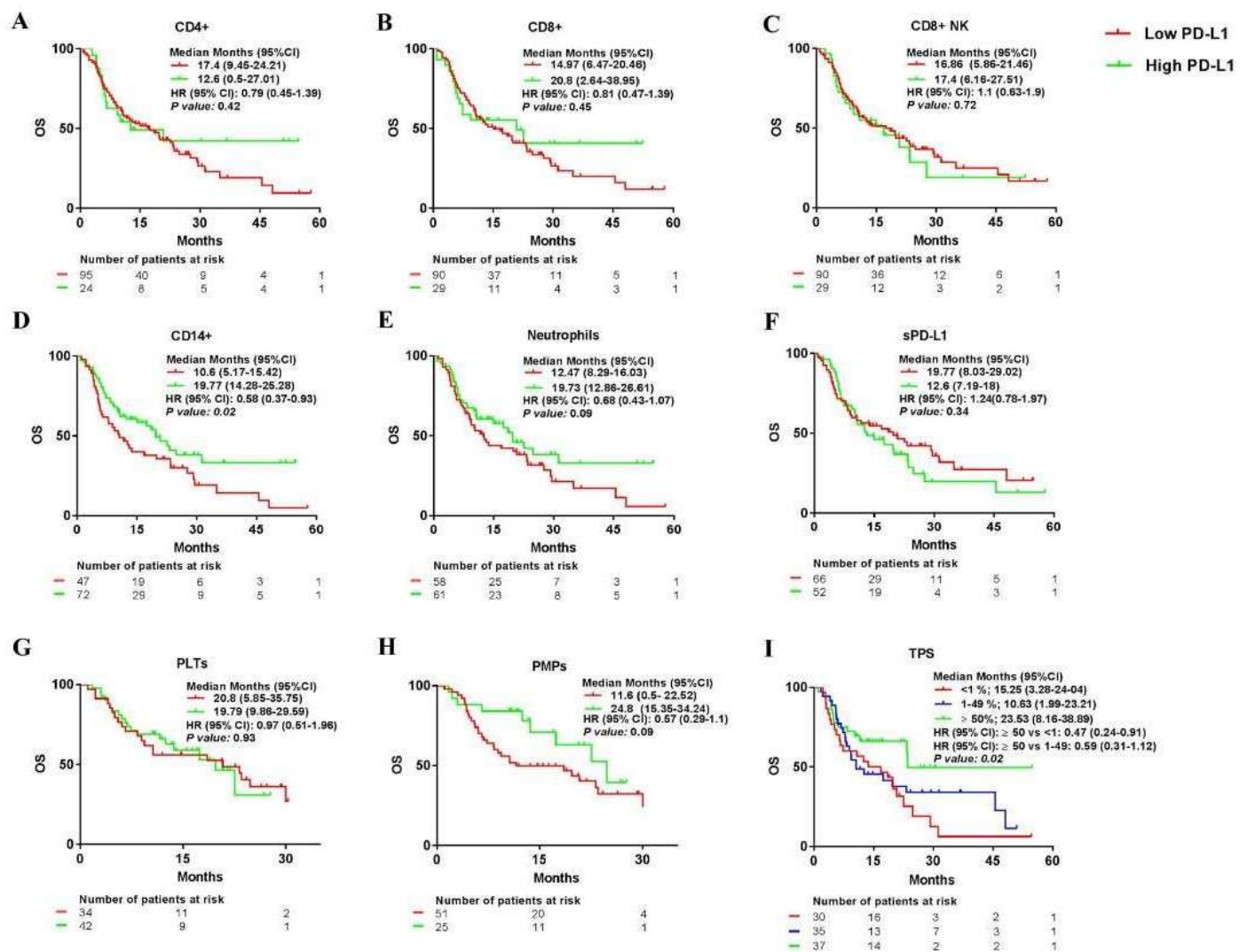


Fig. 4 Median overall survival comparing high and low percentage of PD-L1+leukocytes, PD-L1+PLTs and PMPs, plasma sPD-L1 levels, and tumor PD-L1 expression. Median progression-free survival (PFS) according to high or low group of **a** PD-L1+CD4+, **b** PD-L1+CD8+, **c** PD-L1+CD8+NK cells, **d** PD-L1+CD14+, **e** PD-L1+Neutrophils, **f** pg/ml of sPD-L1, **g** PD-L1+PLTs and **h** PD-L1+PMPs. **i** Tumor proportion score (TPS)

Table 2 Univariate and multivariate analysis for prediction of PFS and OS in patients with advanced NSCLC receiving immunotherapy

Variables	PFS						OS					
	Univariate			Multivariate			Univariate			Multivariate		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
% PD-L1+CD4+	0.98	0.94–1.01	0.27				0.97	0.93–1.01	0.28			
% PD-L1+CD8+	0.95	0.88–1.02	0.18				0.96	0.9–1.03	0.31			
% PD-L1+CD8+NK	0.96	0.91–1.02	0.23				0.97	0.91–1.04	0.42			
% PD-L1+CD14+	0.97	0.96–0.99	0.002	0.98	0.96–0.99	0.001	0.97	0.95–0.99	0.02	0.98	0.96–0.99	0.02
% PD-L1+Neutrophil	0.96	0.93–0.99	0.04				0.94	0.91–0.98	0.04			
% PD-L1+PLTs	0.98	0.95–1	0.06				0.97	0.94–1.1	0.058			
% PD-L1+PMPs	0.89	0.81–0.99	0.04	0.89	0.81–0.99	0.02	0.95	0.88–1.04	0.27			
pg/ml sPD-L1	0.98	0.94–1.03	0.56				1	0.96–1.05	0.75			
% TPS	0.99	0.98–1	0.14				0.98	0.98–0.99	0.031	0.99	0.98–1	0.04

CI Confidence interval, HR Hazard Ratio, OS Overall survival, PMPs Platelet microparticles, PFS Progression free survival, PLTs Platelets, TPS tumor proportion score

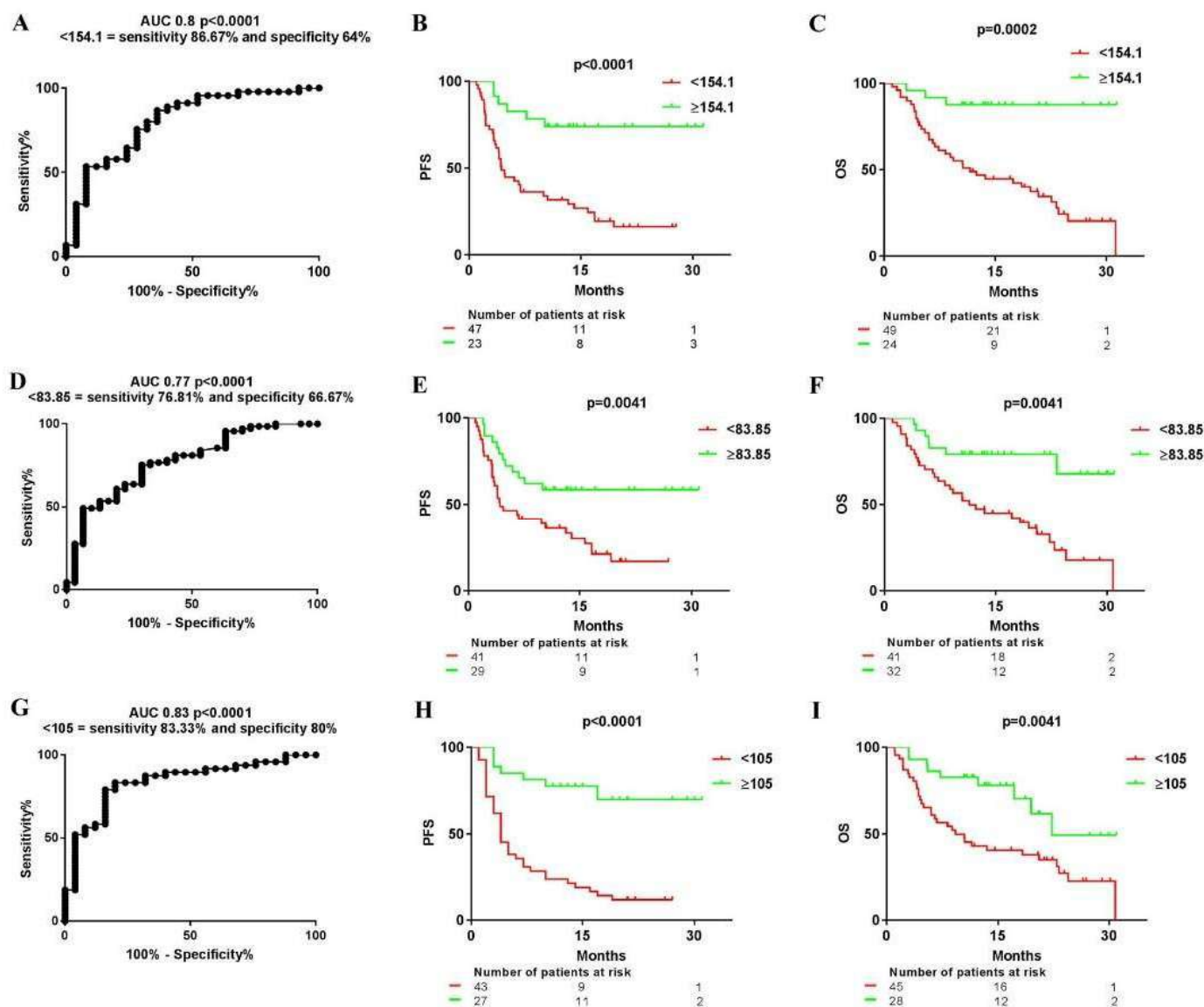


Fig. 5 Median progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) in different groups of patients with NSCLC achieved according to the integration of PD-L1 data (IPD) from different systemic and tumor sources. **a** ROC curve comparing the integrated PD-L1 data (IPD) from systemic and tumor PD-L1 sources (leukocytes, PLTs and PMPs, sPD-L1 and TPS) from patients with progressive versus non-progressive disease to PD-(L)1 blockade agents to obtain the best cut-off point to discriminate them. **b** Median PFS and **c** median OS according to the cut-off point (154.1). **d** ROC curve compar-

ing the IPD from PD-L1+CD14+ and tumor PD-L1 expression from patients with progressive versus non-progressive disease to PD-(L)1 blockade agents. **e** Median PFS and **f** median OS according to the cut-off point (83.85). **g** ROC curve comparing the IPD from PD-L1+leukocytes, PD-L1+PLTs and PMPs and plasma sPD-L1 levels from patients with progressive versus non-progressive disease to PD-(L)1 blockade agents. **h** Median PFS and **i** median OS according to the cut-off point (105)

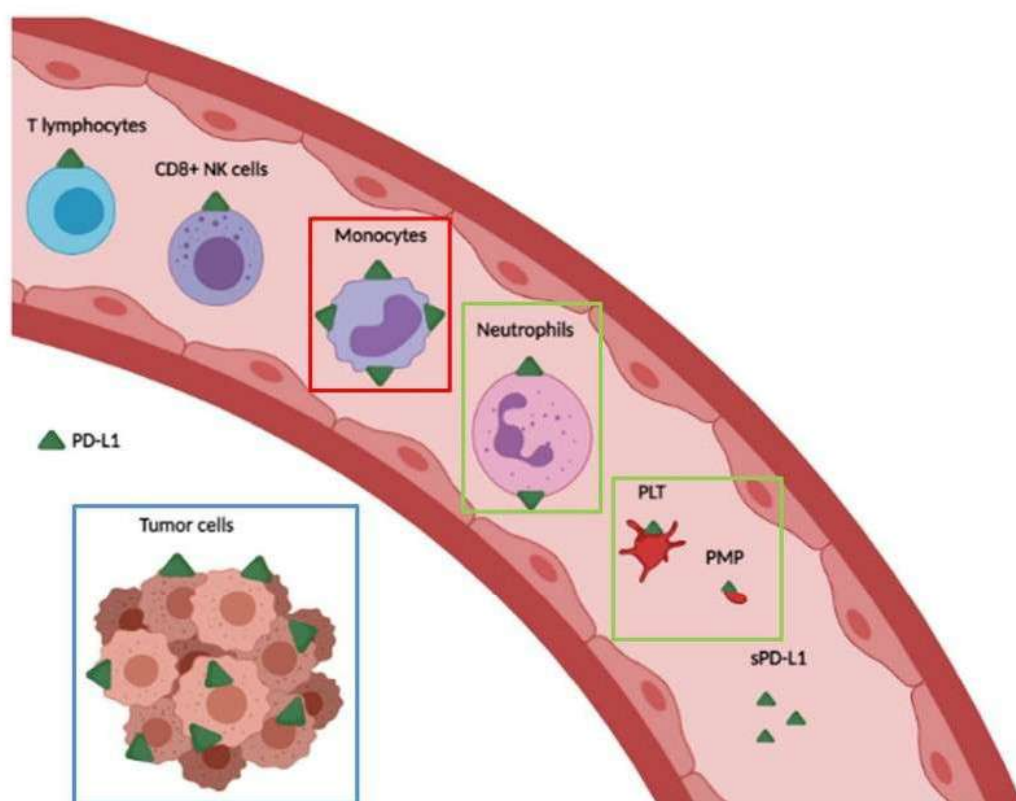
Discussion

Our results have shown that patients with advanced NSCLC presented a high percentage of circulating PD-L1+leukocytes, PD-L1+PLTs and PMPs, and plasma sPD-L1. Patients with NSCLC that had higher percentage of PD-L1+myeloid cells, PLTs, and PMPs before starting PD-(L)1 therapy had a better outcome with that treatment, suggesting that these PD-L1 sources may correlate with the efficacy of PD-(L)1 blockade agents (Fig. 6). Thus, our

results suggest that the integration of tumor and circulating PD-L1 sources may be a better predictor of the clinical outcomes of PD-(L)1 blockade agents in patients with advanced NSCLC than PD-L1 tumor expression alone.

We found a weak correlation of PD-L1 levels between myeloid and lymphoid cells. Although PD-L1 percentage is upregulated in the majority of leukocytes by IFN or TNF- α [4, 24–26], anti-inflammatory cytokines, such as IL-10, TGF- β , and IL-25, can induce PD-L1 expression, mainly on monocytes [27, 28]. Moreover, we observed that percentages

Fig. 6 A model of the systemic and local PD-L1 sources in patients with advanced NSCLC. The PD-L1 sources that we have associated with the clinical outcome of patients with advanced NSCLC treated with anti-PD-(L)1 blockade agents are highlighted with color squares. We found that higher percentages of PD-L1 + monocytes were associated with longer PFS and OS, higher percentages of PD-L1 + neutrophils, PLTs, and PMPs with PFS, and higher percentages of PD-L1 + tumor cells with OS. Figure created with Biorender.com



of PD-L1 + subpopulations of leukocytes, PLTs, and PMPs, and sPD-L1 levels were not correlated with tumor PD-L1 expression in patients with advanced NSCLC. This finding has been described previously with regard to sPD-L1 concentrations and PD-L1 expression on the tumor samples of patients with advanced NSCLC [21]. We did not find differences in sPD-L1 according to response in patients with negative tumor PD-L1 expression (data not shown).

It has been shown that a higher percentage of PD-L1 + leukocytes can inhibit anti-tumor responses. Therefore, it is possible that patients with advanced NSCLC with a higher percentage of PD-L1 + leukocytes and negative PD-L1 tumor expression would benefit from PD-(L)1 blockade therapy [13, 29].

This is the first time that the presence of PD-L1 on PLTs and PMPs from patients with advanced NSCLC has been found independent of tumor PD-L1 expression. The activated status of PLTs in patients with advanced NSCLC may be the reason for that finding [30]. A high percentage of PD-L1 + PLT has previously been observed in patients with head and neck carcinoma [14]. All these findings suggest that PLT from patients with solid tumors present inhibitory molecules that may compromise antitumor responses. In line with this suggestion, we have observed that patients with advanced NSCLC with higher percentages of PD-L1 + PLTs and PD-L1 + PMPs had longer PFS when treated with PD-(L)1 blockade agents, thereby highlighting

the importance of PLTs as a potential immune-regulatory element in patients with solid tumors.

We also found that patients with advanced NSCLC with higher percentages of PD-L1 + CD14+ and PD-L1 + neutrophils had longer PFS with PD-(L)1 therapy. Additionally, patients with a higher percentage of PD-L1 + CD-14+, PD-L1 + neutrophils, and high tumor PD-L1 expression had longer OS. A higher percentage of PD-L1 + myeloid cells had previously been reported in a cohort of 32 patients with advanced NSCLC and objective response (OR) to PD-(L)1 agents [13].

In our study, no differences in terms of PFS or OS were observed according to plasma sPD-L1 levels or the percentage of PD-L1 + lymphocytes. The role of basal sPD-L1 levels as a predictive biomarker of efficacy has been tested in patients with advanced NSCLC treated with nivolumab with some controversial results. Constantini and Ando et al. did not observe statistical difference in basal sPD-L1 concentrations between responders and non-responders to nivolumab or those with clinical benefit. However, increasing of sPD-L1 concentration after anti-PD-(L)1 therapy was associated with poor response, less tumor regression, and non-clinical benefit to immunotherapy in cancer patients [20, 21]. In addition, Okuma Y. et al. found that patients with low plasma sPD-L1 had a longer OS [15] and patients with advanced NSCLC and high sPD-L1 levels had worse prognosis than those with low sPD-L1 levels [15, 31, 32].

Regarding lymphocytes, a correlation between a higher percentage of PD-L1 + CD4+ and PD-L1 + CD8+ T lymphocytes and prolonged OS and PFS in patients with melanoma treated with ipilimumab ± nivolumab has been reported [33]. However, this correlation between the expression of PD-L1 on lymphocytes and clinical outcome was probably related to the existence of a negative immune context characterized by the presence of myeloid dendritic suppressor cells and Tregs rather than the contribution of PD-L1 + lymphocytes [34].

Collection of whole blood is a non-invasive method and can easily be obtained, and this fact supports the potential of systemic PD-L1 expression as a complementary predictive biomarker. Since we observed that systemic and local PD-L1 were independent predictive biomarkers of clinical outcome in patients with advanced NSCLC, we have confirmed our hypothesis that global PD-L1 expression has the potential capacity to suppress anti-tumor response. Although our multivariate analysis showed that the combination of a high percentage of PD-L1 + CD14+ and high tumor PD-L1 expression was the most significant predictive biomarkers of OS, the best prediction of treatment outcome was obtained when we included all systemic and local sources of PD-L1 in the IPD.

This study has several limitations. Although the sample size is not small, a larger cohort of patients and a longer follow-up would be required to validate our findings. Nevertheless, we did observe significant results regarding survival. Furthermore, it would be necessary to use a validation cohort with a control group to confirm the predictive value of systemic PD-L1. We have included patients receiving PD-(L)1 blockade agents in different treatment lines, and in combination with chemotherapy or other immunotherapeutic agents, which may impact the patients' outcomes. However, similar results were observed in patients with NSCLC treated with PD-(L)1 alone. Lastly, the percentages of circulating PD-L1 + leukocytes, PLTs, PMPs, and plasma sPD-L1 were only analyzed at baseline, and the evaluation of the dynamic changes during treatment with PD-(L)1 blockade agents would be more helpful to predict the treatment outcomes of patients with NSCLC.

In conclusion, an approach based on integrating systemic immune-related biomarkers and tumor PD-L1 expression could better stratify patients according to the potential efficacy of PD-(L)1 blockade agents. These findings could be helpful when deciding on the best treatment strategy for patients with advanced NSCLC who are candidates for PD-(L)1 blockade agents.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00262-021-03107-y>.

Acknowledgments SV was supported by “Fondo Investigaciones Sanitarias” and a participant in the Program for the Stabilization of Investigators from the “Direcció i d'Estrategia I Coordinació del Departament Salut de la Generalitat de Catalunya.”

Authors' contributions All authors were involved in revising intellectual content, and all authors approved the final version for publication. CZ, MM, LA, and MAO performed cellular staining and flow cytometry analysis and ELISAs. CZ and MM and MAO analyzed results of flow cytometry and ELISAs; GA, MR, IS, AB, JS, OG, JG, and MM collected samples and clinical data; CZ and SV performed statistical analysis. GA, CZ, MM and SV wrote the manuscript. MM, and SV designed the study.

Funding This work was supported by the Bristol Myers Squibb.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration and approved by the Research Ethics Board of Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona (IIBSP-PDL-2017-82).

References

1. Nixon NA, Blais N, Ernst S et al (2018) Current landscape of immunotherapy in the treatment of solid tumours, with future opportunities and challenges. *Curr Oncol* 25:e373–e384. <https://doi.org/10.3747/co.25.3840>
2. Bocanegra A, Blanco E, Fernandez-Hinojal G et al (2020) PD-L1 in systemic immunity: unraveling its contribution to PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy. *Int J Mol Sci* 21:1–17
3. Hui R, Gandhi L, Carcereny Costa E et al (2016) Long-term OS for patients with advanced NSCLC enrolled in the KEYNOTE-001 study of pembrolizumab (pembro). *J Clin Oncol* 34:9026–9026. https://doi.org/10.1200/jco.2016.34.15_suppl.9026
4. Hartley G, Regan D, Guth A, Dow S (2017) Regulation of PD-L1 expression on murine tumor-associated monocytes and macrophages by locally produced TNF- α . *Cancer Immunol Immunother* 66:523–535. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-1955-5>
5. Hallqvist A, Rohlin A, Raghavan S (2020) Immune checkpoint blockade and biomarkers of clinical response in non-small cell lung cancer. *Scand J Immunol* 92. <https://doi.org/10.1111/sji.12980>
6. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR et al (2012) Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in Cancer. *N Engl J Med* 366:2443–2454. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1200690>
7. Cottrell TR, Taube JM (2018) PD-L1 and emerging biomarkers in immune checkpoint blockade therapy. *Cancer J (United States)* 24:41–46
8. Prelaj A, Tay R, Ferrara R et al (2019) Predictive biomarkers of response for immune checkpoint inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cancer* 106:144–159
9. Riudavets M, Auclin E, Mezquita L (2020) Host circulating biomarkers for immune-checkpoint inhibitors: single-agent and combinations. *Futur Oncol* 16:1665–1668
10. Chen DS, Mellman I (2013) Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity* 39:1–10

11. Ilić M, Szafer-Glusman E, Hofman V et al (2018) Detection of PD-L1 in circulating tumor cells and white blood cells from patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 29:193–199. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx636>
12. Arrieta O, Montes-Servín E, Hernandez-Martinez JM, et al (2017) Expression of PD-1/PD-L1 and PD-L2 in peripheral T-cells from non-small cell lung cancer patients. *Oncotarget* 8:101994–102005. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22025>
13. Bocanegra A, Fernandez-Hinojal G, Zuazo-Ibarra M et al (2019) 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. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20071631>
14. Rolfes V, Idel C, Pries R, et al (2018) PD-L1 is expressed on human platelets and is affected by immune checkpoint therapy. *Oncotarget* 9:27460–27470. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25446>
15. Okuma Y, Wakui H, Utsumi H et al (2018) Soluble programmed cell death ligand 1 as a novel biomarker for nivolumab therapy for non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 19:410–417.e1. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2018.04.014>
16. Zhou J, Mahoney KM, Giobbie-Hurder A et al (2017) Soluble PD-L1 as a biomarker in malignant melanoma treated with checkpoint blockade. *Cancer Immunol Res* 5:480–492. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0329>
17. Orme JJ, Jazieh KA, Xie T et al (2020) ADAM10 and ADAM17 cleave PD-L1 to mediate PD-(L)1 inhibitor resistance. *Oncoimmunology* 9. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1744980>
18. Chen G, Huang AC, Zhang W et al (2018) (2018) Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nat* 560:382–386. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0392-8>
19. Orme JJ, Enninga EAL, Lucien-Matteoni F et al (2020) Therapeutic plasma exchange clears circulating soluble PD-L1 and PD-L1-positive extracellular vesicles. *J Immunother cancer* 8:1–7. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001113>
20. Ando K, Hamada K, Watanabe M, et al (2019) Plasma levels of soluble PD-L1 correlate with tumor regression in patients with lung and gastric cancer treated with immune checkpoint inhibitors. *Anticancer Res* 39:5195–5201. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13716>
21. Costantini A, Julie C, Dumenil C et al (2018) Predictive role of plasmatic biomarkers in advanced non-small cell lung cancer treated by nivolumab. *Oncoimmunology* 7. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1452581>
22. Ahmad F, Hong HS, Jäckel M et al (2014) High frequencies of polyfunctional CD8+ NK Cells in Chronic HIV-1 infection are associated with slower disease progression. *J Virol* 88:12397. <https://doi.org/10.1128/JVI.01420-14>
23. Lindgren Å, Yun CH, Lundgren A et al (2010) CD8- natural killer cells are greatly enriched in the human gastrointestinal tract and have the capacity to respond to bacteria. *J Innate Immun* 2:294–302. <https://doi.org/10.1159/000286238>
24. Bazhin AV, von Ahn K, Fritz J et al (2018) Interferon- α up-regulates the expression of PD-L1 molecules on immune cells through STAT3 and p38 signaling. *Front Immunol* 9:2129. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02129>
25. Munir S, Lundsager MT, Jørgensen MA, et al (2019) Inflammation induced PD-L1-specific T cells. *Cell Stress* 3:319–327. <https://doi.org/10.15698/cst2019.10.201>
26. de Kleijn S, Langereis JD, Leentjens J et al (2013) IFN- γ -stimulated neutrophils suppress lymphocyte proliferation through expression of PD-L1. *PLoS ONE* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072249>
27. Maine CJ, Aziz NHA, Chatterjee J et al (2014) Programmed death ligand-1 over-expression correlates with malignancy and contributes to immune regulation in ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother* 63:215–224. <https://doi.org/10.1007/s00262-013-1503-x>
28. Wang WB, Yen ML, Liu KJ et al (2015) Interleukin-25 mediates transcriptional control of PD-L1 via STAT3 in multipotent human mesenchymal stromal cells (hMSCs) to suppress Th17 responses. *Stem Cell Reports* 5:392–404. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.07.013>
29. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D et al (2017) Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 389:255–265. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32517-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32517-X)
30. Gong L, Cai Y, Zhou X, Yang H (2012) Activated platelets interact with lung cancer cells through P-selectin glycoprotein ligand-1. *Pathol Oncol Res* 18:989–996. <https://doi.org/10.1007/s12253-012-9531-y>
31. Meyo MT, Jouinot A, Giroux-Leprieux E et al (2020) Predictive value of soluble PD-1, PD-L1, VEGFA, CD40 ligand and CD44 for nivolumab therapy in advanced non-small cell lung cancer: a case-control study. *Cancers (Basel)* 12. <https://doi.org/10.3390/cancers12020473>
32. Zhang J, Gao J, Li Y et al (2015) Circulating PD-L1 in NSCLC patients and the correlation between the level of PD-L1 expression and the clinical characteristics. *Thorac Cancer* 6:534–538. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12247>
33. Jacquilot N, Roberti MP, Enot DP et al (2017) Predictors of responses to immune checkpoint blockade in advanced melanoma. *Nat Commun* 8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00608-2>
34. Brochez L, Meireson A, Chevolet I et al (2018) Challenging PD-L1 expressing cytotoxic T cells as a predictor for response to immunotherapy in melanoma. *Nat Commun* 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05047-1>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Authors and Affiliations

Carlos Zamora Atenza¹ · Geòrgia Anguera^{2,3} · Mariona Riudavets Melià^{2,4} · Leticia Alserawan De Lamo⁵ · Ivana Sullivan² · Andrés Barba Joaquin² · Jorgina Serra Lopez² · M. Angels Ortiz¹ · Maria Mulet¹ · Sílvia Vidal¹ · Margarita Majem² 

Carlos Zamora Atenza
czamora@santpau.cat

Geòrgia Anguera
ganguera@santpau.cat

Mariona Riudavets Melià
mariona.riudavets@gustaveroussy.fr

Leticia Alserawan De Lamo
lalserawan@santpau.cat

Ivana Sullivan
isullivan@santpau.cat

Andrés Barba Joaquin
abarba@santpau.cat

Jorgina Serra Lopez
jserral@santpau.cat

M. Angels Ortiz
mortiz@santpau.cat

Maria Mulet
mmulet@santpau.cat

Sílvia Vidal
svidal@santpau.cat

¹ Group of Immunology-Inflammatory Diseases, Biomedical Research Institut Sant Pau (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain

² Department of Medical Oncology, Hospital de La Santa Creu I San Pau. C, Sant Antoni Maria Claret 167 08025, Barcelona, Spain

³ Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain

⁴ Department of Medical Oncology, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

⁵ Department of Immunology, Hospital de La Santa Creu I Sant Pau, Barcelona, Spain

4.2 Análisis del papel potencial de los leucocitos-PD-L1+ circulantes como factor predictor de respuesta al tratamiento con inhibidores del PD-(L) 1 en CPCNP

En este apartado se incluye la publicación descrita a continuación:

Título:

Potential Role of Circulating PD-L1⁺ Leukocytes as a Predictor of Response to Anti-PD-(L)1 Therapy in NSCLC Patients

Biomedicines 2024, Apr 25;12(5), 958;

<https://doi.org/10.3390/biomedicines12050958>

PMID: 38790920

Autores:

Georgia Anguera*, Maria Mulet*, Carlos Zamora, Rubén Osuna-Gómez, Andrés Barba, Ivana Sullivan, Jorgina Serra-López, Elisabet Cantó, Silvia Vidal and Margarita Majem.

* co-primeros autores

Departamento de Oncología Médica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y
Departamento de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.



Article

Potential Role of Circulating PD-L1⁺ Leukocytes as a Predictor of Response to Anti-PD-(L)1 Therapy in NSCLC Patients

Georgia Anguera ^{1,2,†}, Maria Mulet ^{3,*,†}, Carlos Zamora ³, Rubén Osuna-Gómez ^{3,4}, Andrés Barba ¹, Ivana Sullivan ¹, Jorgina Serra-López ¹, Elisabet Cantó ³, Silvia Vidal ^{3,4,‡} and Margarita Majem ^{1,‡}

¹ Department of Medical Oncology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; ganguera@santpau.cat (G.A.); abarba@santpau.cat (A.B.); isullivan@santpau.cat (I.S.); jserral@santpau.cat (J.S.-L.); mmajem@santpau.cat (M.M.)

² Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

³ Group of Inflammatory Diseases, Institut de Recerca Sant Pau (IR Sant Pau), 08041 Barcelona, Spain; carlosza86@gmail.com (C.Z.); rosuna@santpau.cat (R.O.-G.); ecanto@santpau.cat (E.C.); svidal@santpau.cat (S.V.)

⁴ Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

* Correspondence: mmulet@santpau.cat

† These authors contributed equally to this work and share first authorship.

‡ These authors contributed equally to this work, supervising this study as co-senior authors.

Abstract: PD-(L)1 inhibitors are part of the treatment strategy for non-small cell lung cancer (NSCLC) although its efficacy is limited to certain patients. Our study aimed to identify patients who might benefit from anti-PD-(L)1 inhibitors by analyzing the PD-L1 expression on circulating leukocytes and its evolution during treatment. One hundred thirteen NSCLC patients, according to their radiological response after 10–12 weeks of treatment, were classified into responders, stable, and progressive disease. Percentages of circulating PD-L1⁺ leukocytes, PD-L1⁺ platelets (PLTs), and leukocyte-PLT complexes were assessed using flow cytometry, and plasma concentrations of soluble immunomodulatory factors were quantified by ELISA. Responders exhibited significantly higher pre-treatment percentages of PD-L1⁺ neutrophils, PD-L1⁺ CD14⁺ cells, and PD-L1⁺ PLTs than progressors. The percentages of these populations decreased in responders post-treatment, contrasting with stables and progressors. PLTs notably contributed to PD-L1 expression in CD14⁺ cells and neutrophils. Plasma cytokine analysis revealed baseline differences only in IL-17 concentration among groups, whereas network analyses highlighted distinct association patterns between plasma molecules and PD-L1⁺ leukocytes after 10–12 weeks of treatment. Our findings suggest that pre-treatment assessment of circulating PD-L1⁺ neutrophils, PD-L1⁺ CD14⁺ cells, and PD-L1⁺ PLTs may be helpful in identifying NSCLC patients who are potential candidates for anti-PD-(L)1 therapy.

Keywords: NSCLC; immunotherapy; PD-L1⁺ neutrophils; PD-L1⁺ CD14⁺ cells; PD-L1⁺ platelets



Citation: Anguera, G.; Mulet, M.; Zamora, C.; Osuna-Gómez, R.; Barba, A.; Sullivan, I.; Serra-López, J.; Cantó, E.; Vidal, S.; Majem, M. Potential Role of Circulating PD-L1⁺ Leukocytes as a Predictor of Response to Anti-PD-(L)1 Therapy in NSCLC Patients. *Biomedicines* **2024**, *12*, 958. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12050958>

Academic Editor: Miki Rahat

Received: 6 March 2024

Revised: 9 April 2024

Accepted: 22 April 2024

Published: 25 April 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Immune checkpoint inhibitors (ICIs) have transformed the treatment landscape for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) as well as other tumors [1–3]. This shift in treatment paradigms has been seen since the approval of anti-PD-(L)1 therapy (nivolumab [4,5], pembrolizumab [6], and atezolizumab [7]) in the second-line setting, together with the establishment of the role of ICI in first-line therapy, both alone [8] or in combination with chemotherapy [9–12]. Unfortunately, there is still a significant proportion of patients with NSCLC that are either refractory or develop resistance to anti-PD-(L)1 therapy [13,14].

The identification of reliable biomarkers for predicting ICI response or resistance remains an unmet need. Such markers are essential for guiding treatment decisions, minimizing unnecessary toxicity, and managing economic costs. Although PD-L1 immunohistochemistry testing in tumor samples is recommended by international guidelines [15],

it has several limitations, including variability in results with different immunohistochemistry clones and the requirement for enough tissue material [15], among others. Other potential biomarkers, such as tumor mutational burden and peripheral blood markers like PLT-to-lymphocyte ratio, neutrophil-to-lymphocyte ratio, and the lung immune prognostic index score, have been explored; however, their potential predictive role has not as yet been fully clarified [16,17].

In recent years, there have been significant advances in the understanding of the molecular and cellular pathogenesis of NSCLC. It is well-documented that tumor cells employ various mechanisms to evade immune surveillance, including the expression of coinhibitory molecules such as PD-L1 [10]. This molecule is not restricted to tumor cells as immune infiltrating cells can also express PD-L1. The interaction between PD-L1 and its receptor, PD-1, expressed in T cells, elicits inhibitory signals within T cells, dampening their cytotoxic activity against the tumor [14,18]. Anti-PD-(L)1 therapy disrupts this interaction, thereby unleashing the immune system's ability to target and destroy cancer cells. Higher levels of PD-L1 expression on tumor cells are often related to a higher probability of response to anti-PD-(L)1 therapy [19]. Additionally, PD-L1 can also be detected in the bloodstream as a soluble molecule (sPD-L1), with higher concentrations observed in patients with NSCLC compared to healthy donors (HD) [20]. Increased sPD-L1 concentration after anti-PD-(L)1 therapy is associated with a lack of clinical benefit from ICI and also with a worse prognosis [21].

Historically considered primarily as blood clotting agents, PLTs have increasingly been recognized as key modulators of the immune response within the tumor microenvironment. Through both direct and indirect interactions with leukocytes, PLTs regulate several aspects of tumor-associated pathology, including tumor growth and metastasis. In a previous publication, we demonstrated that patients with NSCLC exhibit higher percentages of circulating leukocyte-PLT complexes compared to HD and, particularly, complexes of CD4⁺ T cell-PLTs and CD14⁺ cell-PLTs can be used as a predictive biomarker of the development and severity of immune-related adverse events associated to ICI therapy [22]. Recent reports also indicate that PLTs may increase PD-L1 expression in cancer conditions, potentially attenuating the antitumor immune response [23]. Hinterleitner et al. experimentally demonstrated that PD-L1 is transferred from tumor cells to PLTs preserving its immunomodulatory properties. Moreover, they also designed an algorithm considering the activation-dependent expression change in PD-L1 PLTs, demonstrating superior effectiveness in predicting ICI response compared to histologically tumor PD-L1 quantification. Patients identified with high algorithm values exhibited shorter overall survival (OS) [24].

Currently, the analysis of leukocyte and PLT phenotypes has provided valuable insights into the research of biomarkers that predict the efficacy of ICI in cancer patients. We have previously reported that patients with higher percentages of PD-L1⁺ CD14⁺ cells, PD-L1⁺ neutrophils, and PD-L1⁺ PLTs had significantly longer progression-free survival (PFS) [20]. In regard to OS, patients with higher percentages of PD-L1⁺ CD14⁺ cells and high tumor PD-L1 expression exhibited longer OS [20].

Based on all these findings, we hypothesize that baseline levels and changes in PD-L1 expression on specific leukocyte populations in the blood may influence the response to anti-PD-(L)1 treatment in advanced NSCLC patients. First, we explored the kinetics of PD-L1 expression on distinct leukocyte populations during the first 24 weeks of anti-PD-(L)1 therapy, comparing responding, stable, and progressing patients undergoing anti-PD-(L)1 treatment. Second, we determined the contribution of PLTs to PD-L1 expression in leukocytes. Finally, we constructed a correlation network to explore changes in cellular and molecular connectivity patterns among patients with different treatment responses and integrated parameters to identify the strongest predictors of response with a multinomial logistic regression.

2. Materials and Methods

2.1. Patient Cohort and Sample Collection

This prospective study included 113 patients with advanced NSCLC (IV stage) undergoing anti-PD-(L)1 treatment at a single institution (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona). Whole blood samples were collected in heparinized BD Vacutainer tubes (BD, Franklin Lakes, NJ) before starting anti-PD-(L)1 therapy ($t = 0$) and then every 4–6 weeks until 22–24 weeks ($t = 4–6$ w, $t = 10–12$ w, $t = 16–18$ w, $t = 22–24$ w). Patient recruitment started in May 2015 and finished in September 2019, and the follow-up period ended in November 2022. The median follow-up was 58 months (39–88). All patients received at least one dose of anti-PD-(L)1 treatment. Treatment was discontinued in cases of progressive disease by Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) or Immune-Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (iRECIST), loss of clinical benefit, treatment completion, or unacceptable treatment-related toxicity. All patients signed the written informed consent, and this research adhered strictly to the ethical principles outlined in the Helsinki Declaration and received approval from the Research Ethics Board of Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Patient data were collected from electronic medical records.

2.2. Evaluation of Response to Immunotherapy by Radiological Assessment

Radiological assessments were conducted before starting anti-PD-(L)1 treatment and every 10–12 weeks thereafter. Additional scans were performed at the physician's discretion when deemed necessary. Patients were classified according to their response to the first radiological evaluation (10–12 weeks) into three groups: progressive disease (PD), stable disease (SD), and responders (R). Responders were further subclassified into partial response (PR) and complete response (CR). Response evaluation was assessed locally according to RECIST 1.1 or iRECIST criteria. Cases in which radiological evaluation could not be performed due to the patient's death were classified as PD.

2.3. Immunophenotyping

One hundred microliters of whole blood were stained with anti-CD3-PECy7 (BioLegend, San Diego, CA, USA; clone HIT3a), anti-CD8-PECy5 (BioLegend; clone SK1), anti-PD-L1-PE (BioLegend; clone 29E.2A3), anti-CD14-PECy7 (BD Bioscience, San Jose, CA, USA; clone M5E2), anti-CD41a-FITC (Immunotools, Friesoythe, Germany; clone HIP8), and anti-CD62P-APC (Immunotools; clone HI62P). The cells were then incubated for 15 min in the dark before adding 2 mL of BD FACS lysing solution 1X (BD Bioscience) for 10 min. Finally, the cells were washed with 2 mL of PBS 1X and resuspended in 400 μ L of PBS 1X before acquisition by flow cytometry (MACSQuant Analyzer 10 flow cytometer; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Negative gates for each marker were defined by fluorescence minus one (FMO) controls.

2.4. Flow Cytometry Analysis

After doublet exclusion, lymphocytes were first gated based on their morphology by Side Scatter (SSC) and Forward Scatter (FSC). Specifically, CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes were identified as CD3⁺ CD8[−] and CD3⁺ CD8⁺ cells, respectively, in the lymphocytes gate. NK cells were gated as CD3[−] CD8⁺ cells. Monocytes were selected according to positive CD14 expression and SSC, whereas neutrophils were identified by high SSC and negative CD14 expression. PLTs were identified as CD41a⁺ events in FSC and SSC plots on a logarithmic scale and activated PLTs as CD41a⁺ CD62P⁺ events. The PLT gate region was previously established using a blend of size-calibrated fluorescent beads with sizes ranging from 0.22 to 1.35 μ m (Spherotech, Green Oaks, IL, USA). Leukocytes with bound PLTs were identified by previous specific markers plus CD41a⁺ cells, as shown in Figure S1. PD-L1 expression was analyzed in all leukocyte populations studied. The percentage of PD-L1 positive cells (PD-L1⁺), defined by a fluorescent minus one strategy for each population, was obtained using FlowJo version X (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA).

During treatment, changes in the percentages of PD-L1⁺ leukocytes were categorized into three groups: those with a >10% decrease, those with no significant change (with less than a 10% change), and those with a >10% increase [25].

2.5. Determination of Soluble Mediators

The concentrations of sPD-L1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), IL-17A (Peprotech, London, UK), IL-6, IL-10 (Immunotools), IFN- γ (Mabtech, Nacka Strand, Sweden), and sIL-6R (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), were measured in the plasma of NSCLC patients treated with PD-(L)1 at baseline and upon 10–12 weeks of follow-up (coinciding with the timing of the first radiological evaluation). All these soluble molecules were quantified using the standard curves provided by the corresponding ELISA kits [26]. The lower limits of detection were 4.69 pg/mL for sPD-L1, 10 pg/mL for IL-17A, 6.1 pg/mL for IL-6, 16 pg/mL for IL-10, 4 pg/mL for IFN- γ , and 2 pg/mL for sIL-6R.

2.6. Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using GraphPad Prism Version 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) and XLSTAT version 2021.4 software (Addinsoft, Paris, France). Normal data distribution was assessed by the Kolmogorov–Smirnov test. Qualitative variables were presented as numbers and percentages $\pm$ standard error of the mean (SEM) whereas quantitative variables were described as median plus interquartile range (IQR). The analysis of covariance (ANCOVA) method was used to examine the influence of smoking status on PD-L1⁺ leukocyte populations in NSCLC patients classified according to their response to anti-PD-(L)1 therapy. Comparisons between more than two groups were performed using the one-way analysis of variance (ANOVA) with the Bonferroni correction (parametric data) and the Kruskal–Wallis test with Dunn’s post hoc correction (non-parametric data). Paired variables, monitored every 4–6 weeks upon six months, were analyzed by ANOVA with the Tukey post hoc correction for parametric data and the Friedman test with Dunn’s post hoc correction for non-parametric data. A multinomial logistic regression analysis was performed to identify the risk factors associated with anti-PD-(L)1 response. Otherwise, the early effects of anti-PD-(L)1 therapy were assessed after 4–6 weeks of treatment using the χ^2 test to compare changes among PD, SD, and R patients. All *p*-values were based on a two-sided hypothesis, and those under <0.05 were considered statistically significant. In regard to soluble factors, the Wilcoxon test was used to compare the baseline and 10–12 week time points.

Network analyses were performed to visualize complex and simultaneous interactions between PD-L1⁺ leukocytes and studied soluble mediators. This analysis was carried out 10–12 weeks after initiation for each of the three studied groups using the JASP 0.17.2 (Amsterdam, The Netherlands). This kind of analysis is grounded in a multivariate statistical approach, where variables are referred to as nodes and connections between the nodes are called edges [27]. Edges of a network can be interpreted as the full conditional association between two nodes after conditioning on all other nodes in the network. Blue edges indicate positive correlations, whereas red edges indicate negative correlations. Thicker and denser colored lines represent stronger relationships. To assess the importance of nodes in the network common centrality indices including strength, betweenness and closeness were reported. Strength indicates how strongly a node is directly associated with other nodes in the network. Betweenness measures the importance of a node in the average pathway between another pair of nodes. Closeness quantifies the indirect connectivity between a given node and all other nodes in the network.

3. Results

3.1. Patients’ Clinicopathological Characteristics

Patients’ clinicopathological characteristics are summarized in Table 1. Male patients constituted 77% of the cohort. The median age of the study participants was 65 years (36–84) with the majority being current or former smokers (90.3%). Non-squamous histology was

the most frequent (71%). Baseline Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOG PS) was 0 in 13.3%, 1 in 73.4%, and 2 in 13.3% of patients.

Table 1. Baseline characteristics of NSCLC patients.

Characteristic	Patients (n = 113)	R Patients (n = 34)	SD Patients (n = 24)	PD Patients (n = 55)
Sex, No. (%)				
Male	87 (77%)	28 (82.4%)	14 (58.3%)	45 (81.8%)
Female	26 (23%)	6 (17.6%)	10 (41.7%)	10 (18.2%)
Age, years Median (range)	65 (36–84)	65 (45–83)	64 (35–86)	66 (48–85)
Smoking status				
Current smokers	34 (30.1%)	13 (38.2%)	7 (29.2%)	14 (25.5%)
Former smokers	68 (60.2%)	19 (55.9%)	14 (58.3%)	35 (63.6%)
Never smokers	11 (9.7%)	2 (5.9%)	3 (12.5%)	6 (10.9%)
Histology				
Squamous	42 (37.2%)	20 (58.8%)	6 (25%)	16 (29.1%)
Non-Squamous	71 (62.8%)	14 (41.2%)	18 (75%)	39 (70.9%)
PD-L1 tumor expression *				
Positive	69 (71.9%)	22 (71%)	16 (76.2%)	31 (70.5%)
Low: <1–49%	35	10	7	15
High: ≥50%	34	12	9	16
Negative	27 (28.1%)	9 (29%)	5 (23.8%)	13 (29.5%)
Treatment Line				
First Line	37 (32.7%)	16 (47.1%)	10 (41.7%)	11 (20%)
Second Line	60 (53.1%)	13 (38.2%)	12 (50%)	35 (63.6%)
Third Line and Beyond	16 (14.2%)	5 (14.7%)	2 (8.3%)	9 (16.4%)
Drug				
Anti-PD-L1	28 (24.8%)	4 (11.8%)	9 (37.5%)	15 (27.3%)
Anti-PD-1	85 (75.2%)	30 (88.2%)	15 (62.5%)	40 (72.7%)
Radiological Response				
Complete Response (CR)	4 (3.6%)	4 (11.8%)	-	-
Partial Response (PR)	30 (26.5%)	30 (88.2%)	-	-
Stable Disease (SD)	24 (21.2%)	-	24 (100%)	-
Progression Disease (PD)	55 (48.7%)	-	-	55 (100%)

* PD-L1 tumor expression was only measured in 96 patients, and the percentages were calculated based on these patients. R, responders; SD, stable disease; PD, progressors. We conducted a chi-square test to compare frequencies, and we have only observed significant differences regarding the histology tumor type ($p = 0.003$).

Tumor PD-L1 expression was evaluated by immunohistochemical staining with the 22C3 antibody (provided in the Dako PharmDx PD-L1 kit) in 85% of patients. Of these, PD-L1 was negative (<1%) in 28.1% of patients, low (1–49%) in 33.3%, and high (≥50%) in 38.6%. Anti-PD-(L)1 treatment was classified as first-line therapy in 32.7% of patients, second-line therapy in 53.1%, and third-line therapy or beyond in 14.2%. Most patients received PD-(L)1 inhibitors as monotherapy (86.8%). Anti-PD-1 was administrated to 75.2% of patients and anti-PD-L1 to 24.8%.

Radiological response after 10–12 weeks of treatment was PD in 48.7% of patients, SD in 21.2%, PR in 26.5%, and CR in 3.6% of patients. The response rate was 30.1%, and the disease control rate was 51.3%. As for the data cut-off in November 2022, 24 patients were still receiving treatment with PD-(L)1 inhibitors. We observed that the distribution by sex, age, and smoking status was comparable in all three groups of patients. However, the chi-square test revealed only significant differences in the frequencies of patients classified according to histology tumor types ($\chi^2 = 11.7$; $p = 0.003$), with the majority of R patients being squamous, whereas non-squamous histology was predominant in SD and PD patients. Further analysis revealed that tumor PD-L1 expression was not significantly associated with anti-PD-(L)1 therapy response.

3.2. Pretreatment PD-L1 Expression in Leukocytes and Platelets

Both R and SD patients showed higher percentages of circulating PD-L1⁺ CD14⁺ cells prior to the first administration of anti-PD-(L)1 compared to PD patients (Figure 1A). R patients had higher percentages of PD-L1⁺ neutrophils compared to PD patients (Figure 1B). Notably, no statistical differences were observed in PD-L1⁺ NK cells according to response groups (Figure 1C).

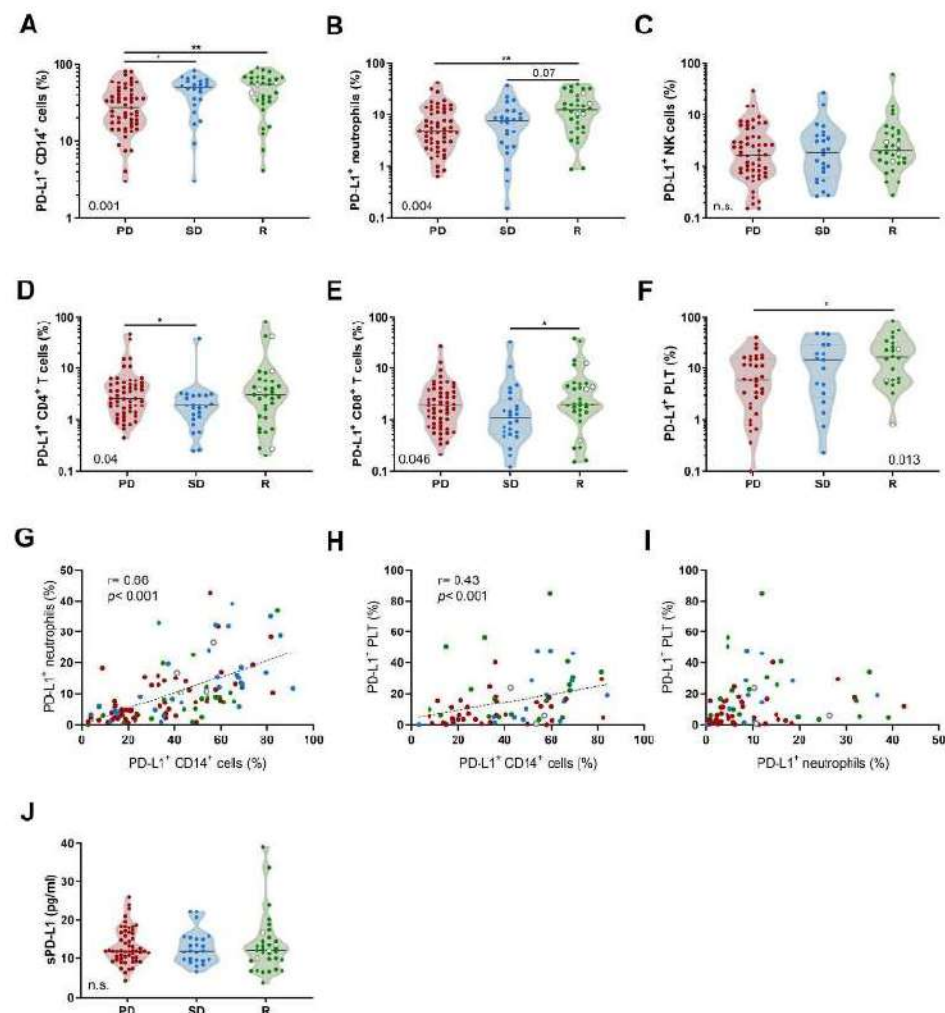


Figure 1. Pretreatment percentages of PD-L1⁺ leukocytes and platelets in NSCLC patients based on anti-PD-(L)1 response. Comparison of PD-L1⁺ (A) CD14⁺ cells, (B) neutrophils, (C) NK cells, (D) CD4⁺ T cells, (E) CD8⁺ T cells, and (F) platelets among PD (n = 55; except for platelets, n = 34), SD (n = 24; except for platelets, n = 17) and R patients (n = 34; except for platelets, n = 22). (G–I) Spearman correlations between PD-L1⁺ CD14⁺ cells, PD-L1⁺ neutrophils, and PD-L1⁺ platelets. (J) Comparison of the plasma sPD-L1 concentrations between PD, SD, and R patients. The white dots represent patients with complete response and green dots represent patients with partial response. Statistical analysis between three groups of patients was performed using the Kruskal–Wallis test with Dunn’s correction. *p*-values are shown in graphs (*) *p* < 0.05; (**) *p* < 0.01. n.s. is not significant.

With regard to lymphoid lineage, PD patients exhibited higher percentages of PD-L1⁺ CD4⁺ T cells compared to SD patients (Figure 1D) and R patients showed higher percentages of PD-L1⁺ CD8⁺ T cells (Figure 1E). The percentages of PD-L1⁺ PLTs were significantly higher in R patients compared to PD patients (Figure 1F). We also observed that percentages of PD-L1⁺ CD14⁺ cells correlated positively with percentages of PD-L1⁺ neutrophils and PD-L1⁺ PLTs (Figure 1G,H). Nevertheless, PD-L1⁺ neutrophils did not correlate with PD-L1⁺ PLTs (Figure 1I). We did not find any correlation between PD-L1⁺

leukocyte subpopulations and PD-L1 tumor expression. Other PD-L1 sources, particularly sPD-L1, did not present significant differences according to response groups (Figure 1J). The percentages of circulating PD-L1⁺ leukocytes and platelets from HD are available in our previous article [20]. We further compared PD-L1 expression among the leukocyte populations according to tumor histology, and we found that there were no differences.

We verified by the ANCOVA method that PD-L1 expression on leukocyte populations in NSCLC patients classified according to their response to anti-PD-(L)1 therapy was not influenced by smoking status.

3.3. Progressive Changes in PD-L1 Expression on Leukocytes and Platelets

PD-L1 expression on distinct leukocyte subpopulations was monitored every 4–6 weeks upon six months of anti-PD-(L)1 therapy. Our investigation revealed a significant decline in the percentages of PD-L1⁺ CD14⁺ cells and PD-L1⁺ neutrophils within the initial 4–6 weeks of therapy in R patients but not in the other groups of patients. Particularly noteworthy, we also found a significant decrease in the percentage of PD-L1⁺ CD14⁺ cells between baseline and weeks 22–24 of treatment in R patients (Figure 2A,B).

Interestingly, the percentage of circulating PD-L1⁺ PLTs also tended to decrease within the initial 4–6 weeks of therapy in R patients (Figure 2C). Regarding NK cells, CD4⁺ and CD8⁺ T cells, no substantial alterations were observed in PD-L1 expression during this period of time in any of the studied groups (Figure S2A–C). These observations suggested the pre-existence of a threshold in PD-L1 expression needs to be surpassed for treatment effectiveness.

Significant differences between frequencies of patients were observed within the first 4–6 weeks of anti-PD-(L)1 therapy between the response groups. Notably, an increase >10% in the proportion of PD-L1⁺ CD14⁺ cells, PD-L1⁺ neutrophils, and PD-L1⁺ PLTs was more frequently observed in the PD group: 43.2% showed an increase in the proportion of PD-L1⁺ CD14⁺ cells, whereas this percentage did not exceed 18.2% for the other groups (Figure 2D); 47.7% displayed an increase in PD-L1⁺ neutrophils, whereas this proportion did not exceed 27.3% for the other groups (Figure 2E); and 43.8% exhibited an increase in PD-L1⁺ PLTs, whereas this did not exceed 28% for R patients (Figure 2F). Additionally, the SD group had the highest proportion of individuals with a decrease of >10% in the percentages of PD-L1⁺ NK cells, followed by R and PD patients (Figure S2D). No differences were observed in the percentage of PD-L1⁺ CD4⁺ and CD8⁺ T cells between the response groups during this period (Figure S2E,F).

3.4. Kinetics of PD-L1⁺ CD14⁺ Cells and Neutrophils with or without Bound Platelets

Next, we analyzed three possible scenarios to explain differences in PD-L1 expression on CD14⁺ cells and neutrophils observed in our cohort of patients. First, considering PLTs as a potential source of PD-L1, it is plausible to suppose that patients exhibited differences in the percentages of leukocyte-PLT complexes according to their response to anti-PD-(L)1. However, no significant differences neither before starting anti-PD-(L)1 therapy nor during 24 weeks of follow-up were observed between groups (Figure 3A–D).

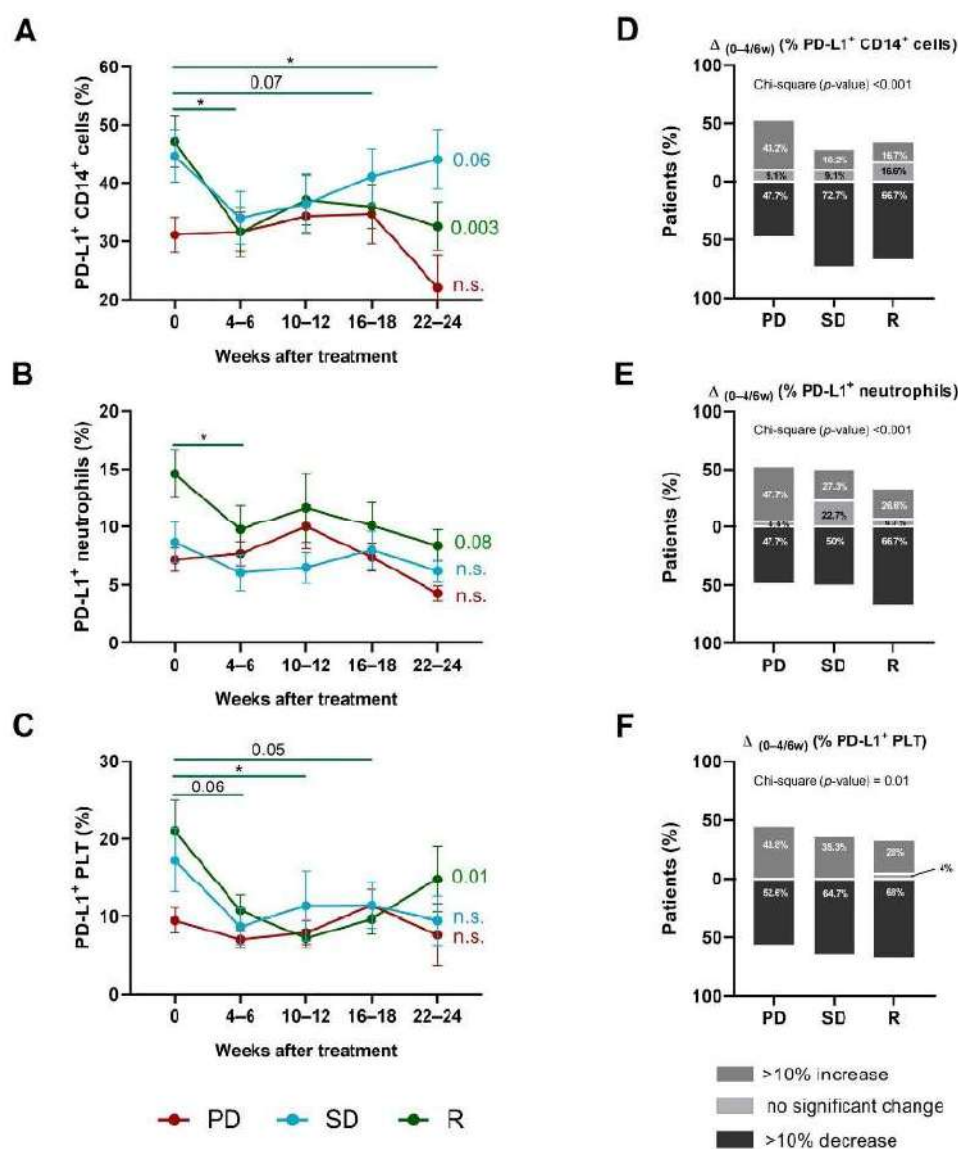


Figure 2. Kinetics of PD-L1⁺ CD14⁺ cells, PD-L1⁺ neutrophils, and PD-L1⁺ platelets in NSCLC patients based on anti-PD-(L)1 response. Percentages of (A) PD-L1⁺ CD14⁺ cells, (B) PD-L1⁺ neutrophils, and (C) PD-L1⁺ platelets during 24 weeks of anti-PD-(L)1 treatment in PD (red line), SD (blue line), and R patients (green line). *p*-values from one-way ANOVAs for each of the three groups are displayed on the right side of each graph, and significant differences between successive time intervals are analyzed by Tukey post hoc comparisons and marked with a line. Changes (>10% decrease (black), no significant change (with less than a 10% change) (light grey), and >10% increase (dark grey)) in the percentages of (D) CD14⁺ cells, (E) neutrophils, and (F) platelets in the first 4–6 weeks of anti-PD-(L)1 treatment. (*) *p* < 0.05; n.s. is not significant.

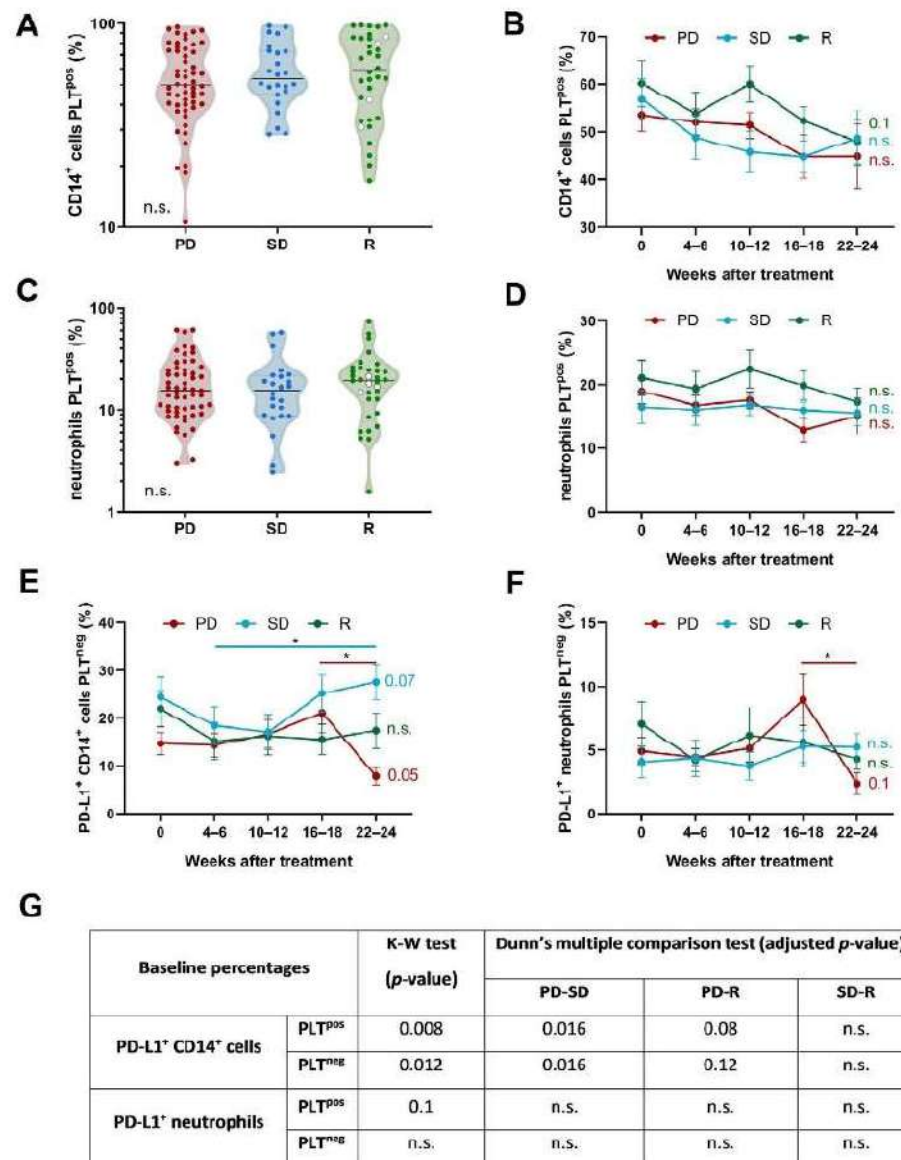


Figure 3. Kinetics of CD14⁺ cells and neutrophils with or without bound platelets and their PD-L1 expression in NSCLC patients based on anti-PD-(L)1 response. (A,B) CD14⁺ cells and (C,D) neutrophils with bound platelets and their evolution throughout 22–24 weeks of treatment in PD (n = 55), SD (n = 24), and R patients (n = 34). White dots represent patients with complete response and green dots patients with partial response. Kinetics of PD-L1⁺ (E) CD14⁺ cells and (F) neutrophils without bound platelets during 24 weeks of anti-PD-(L)1 therapy. *p*-values from one-way ANOVAs for each of the three groups are displayed on the right side of each graph, and significant differences between successive time intervals are analyzed by the Tukey post hoc comparisons and marked with a line. (G) Comparison of pretreatment baseline percentages of PD-L1⁺ CD14⁺ cells and PD-L1⁺ neutrophils with or without bound platelets among NSCLC classified according to their response to anti-PD-(L)1 therapy. Statistical analyses between three groups of patients were performed using Kruskal–Wallis test with Dunn's correction (showed in the table). (*) *p* < 0.05; n.s. is not significant.

We then compared PD-L1 expression on leukocytes with or without bound PLTs to determine the proportion of PD-L1 originating from leukocyte intrinsic expression. The percentage of PD-L1⁺ CD14⁺ cells and PD-L1⁺ neutrophils without bound PLTs decreased after 22–24 weeks of treatment compared to a 4–6-week time point only in PD patients (Figure 3E,F). We also observed that the pretreatment percentage of PD-L1⁺ CD14⁺ cells,

with and without bound PLTs, was significantly lower in PD patients than in SD and R patients (Figure 3G).

3.5. Determination of Plasma Soluble Immunomodulatory Factors' Concentrations and Network Analysis

We observed significant differences in plasma IL-17 concentrations between SD and R patients at baseline (Figure 4A). However, no significant differences were observed in plasma IFN- γ , IL-10, or IL-6, nor in IL-6R concentrations (Figure 4B–E). Notably, we observed that plasma IL-17 concentration increased in R patients after 10–12 weeks of anti-PD-(L)1 treatment but tended to decrease in SD patients (Figure 4A).

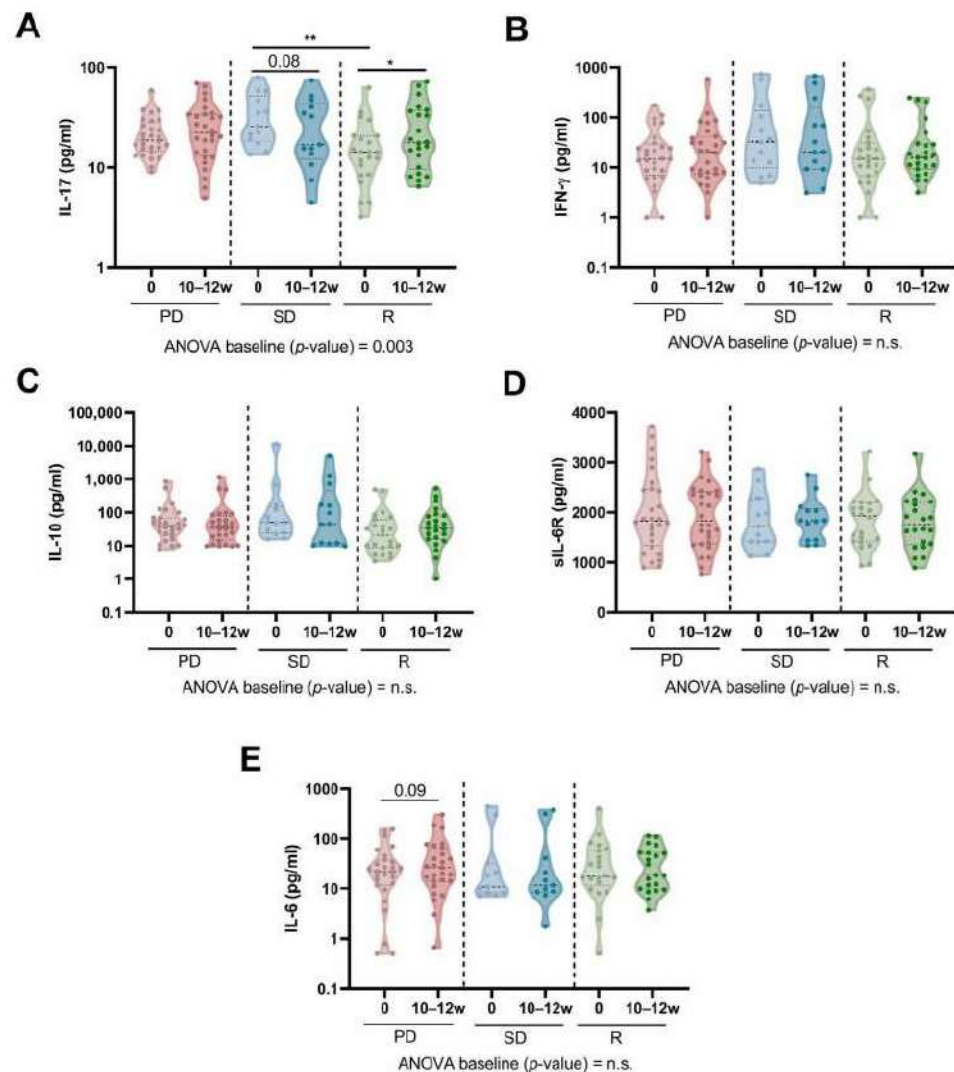


Figure 4. Concentration of plasma-soluble immunomodulatory factors in NSCLC patients based on anti-PD-(L)1 response. (A) IL-17, (B) IFN- γ , (C) IL-10, (D) sIL-6R, and (E) IL-6 concentrations (pg/mL) in plasma from PD, SD, and R patients measured at baseline and after 10–12 weeks of treatment. p -values are shown in graphs (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; n.s. is not significant. The Kruskal–Wallis test with Dunn’s correction was used to compare baseline concentrations between studied groups, whereas the Wilcoxon test was used to compare baseline and 10–12 week time points for each soluble factor.

With all these results, we computed a Network Analysis, not restricted to significant variables, to visualize the potential interactions between PD-L1⁺ leukocyte populations and plasma cytokines in NSCLC patients classified according to their response to anti-PD-

(L)1 treatment (Figure 5A). Different connectivity patterns were observed for all groups of patients after 10–12 weeks of anti-PD-(L)1 treatment: (1) in both PD and SD patients, sIL-6R (node 9) was negatively associated with PD-L1⁺ CD14⁺ cells (node 4), whereas this molecule was positively associated with PD-L1⁺ NK cells (node 3) in R patients; (2) a strong connectivity between PD-L1⁺ myeloid and lymphoid cells in R patients but not in PD and SD patients; (3) a strong positive correlation between PD-L1⁺ neutrophils (node 5) and IL-10 (node 8) and between IL-17 (node 6) and IFN- γ (node 7) in PD patients which was not observed in SD and R patients.

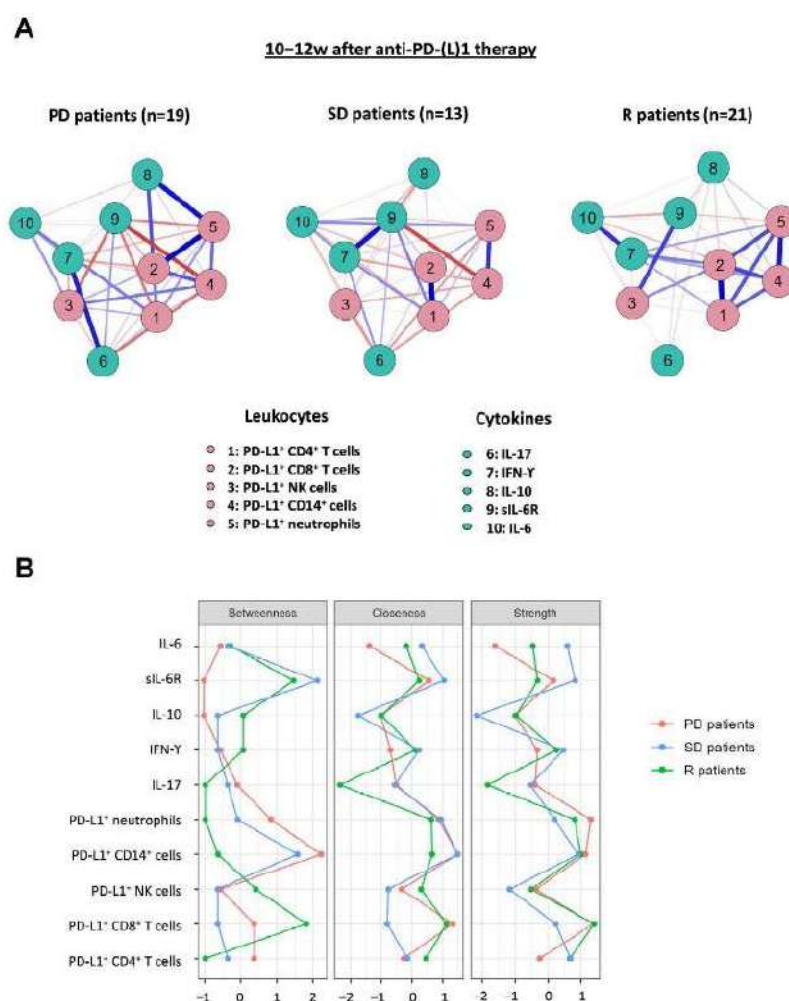


Figure 5. Network diagrams and centrality plots for NSCLC patients treated with anti-PD-(L)1-response at baseline and after 10–12 weeks of treatment. (A) Network model of leukocytes and cytokines interactions in PD (n = 19), SD (n = 13), and R (n = 21) NSCLC after 10–12 weeks of anti-PD-(L)1 therapy. Blue lines represent positive associations, and red lines negative associations. Thicker lines indicate stronger associations. Red nodes represent PD-L1⁺ leukocyte populations and the green ones represent plasma cytokines. Network diagrams were estimated by correlation method. (B) Centrality indices for the network nodes. The x-axis is the raw values of centrality indices and the y-axis represents all the nodes.

The centrality indices of these network analyses are represented in Figure 5B. After 10–12 weeks of anti-PD-(L)1 treatment, the percentage of PD-L1⁺ CD8⁺ T cells exhibited the highest betweenness and strength in R patients. Moreover, plasma sIL-6R concentrations presented higher betweenness in R and SD patients compared to PD patients. This molecule also displayed the highest strength in SD. The percentage of PD-L1⁺ CD14⁺ cells had higher betweenness and closeness in PD and SD patients compared to R.

3.6. Multinomial Logistic Regression Model to Predict Response to Anti-PD-(L)1

To assess the contribution to predicting the response to anti-PD-L1 therapy of those variable that significantly differ at baseline among the studied groups, we conducted a multivariate multinomial logistic regression model, with R patients considered as the reference category (Figure 6A). The model fitting information (Table S1) showed that the full model predicts response to anti-PD-L1 treatment significantly better than the intercept-only model alone. Compared to SD and PD patients, a higher percentage of PD-L1⁺ CD14⁺ cells PLT^{neg} in an NSCLC patient was considered a protective factor, significantly increasing the probability of responding to anti-PD-(L)1 therapy. However, higher IL-17 concentrations were considered a risk factor, decreasing the probability of responding to anti-PD-(L)1 therapy. Additionally, compared to PD, the percentage of PD-L1⁺ neutrophils was also identified as a protective factor. Notably, the pretreatment PD-L1⁺ CD14⁺ cells/IL-17 ratio was significantly higher in R patients compared to PD, and tended to be higher compared to SD (Figure 6B). We did not observe significant differences in PD-L1⁺ CD14⁺ cells/IL-17 ratios after 10–12 weeks of anti-PD-(L)1 treatment among studied groups.

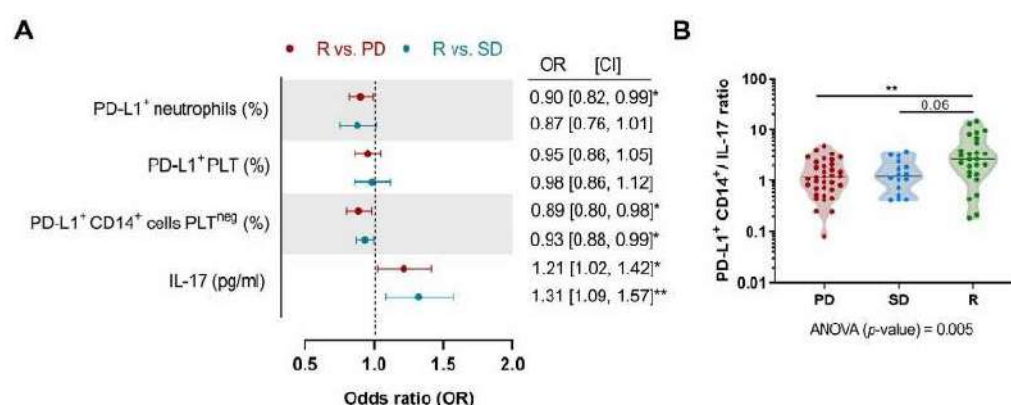


Figure 6. Multinomial logistic regression analysis and pretreatment PD-L1⁺ CD14⁺ cells/IL-17 ratio. **(A)** The reference group is R patients (PD vs. R in red; SD vs. R in blue). Dots represent the odds ratio and the error bars represent the 95% CI. **(B)** Ratio between the percentage of PD-L1⁺ CD14⁺ cells and plasma IL-17 concentration before starting anti-PD-(L)1 therapy. The Kruskal–Wallis test with Dunn’s correction was used to compare the baseline ratio between studied groups. *p*-values are shown in graphs (*) *p* < 0.05; (**) *p* < 0.01. CI, confidence interval.

4. Discussion

Our study highlights the presence of higher percentages of PD-L1⁺ CD14⁺ cells, PD-L1⁺ neutrophils, and PD-L1⁺ PLTs before anti-PD-(L)1 therapy initiation in R patients, but not in SD and PD patients. This finding suggests the pre-existence of an immune milieu associated with the expression of PD-L1 that plays a crucial role in determining patient response. Additionally, this observation may point to the presence of a threshold in the proportion of PD-L1⁺ leukocytes that needs to be surpassed for the treatment to be effective. Consequently, in patients with a low percentage of PD-L1⁺ leukocytes (PD patients), the administration of anti-PD-(L)1 treatment may confer no therapeutic benefit as the tumor may be employing alternative immune evasion mechanisms such as TIM-3/Galectin-9 [28] or TIGIT/CD155 [29,30]. These findings are in line with those we reported previously, where we associated these three populations with longer PFS in NSCLC patients [20]. Here, further exploration of the kinetics of percentages of PD-L1⁺ leukocytes and PLTs unveiled significant changes in PD-L1 expression on CD14⁺ cells, neutrophils, and PLTs within the first 4–6 weeks of treatment, indicating that the treatment has a rapid effect and that it is not necessary to monitor these populations for up to 6 months since no significant changes will be observed. This confers clinical advantages in promptly identifying non-responder patients and allowing for the exploration of further treatments while reducing healthcare costs and toxicity.

Information concerning the relevance of monocytes in predicting the response to PD-(L)1 inhibitors is controversial. On the one hand, in NSCLC patients, higher absolute monocyte counts before starting PD-(L)1 inhibitors correlated with a shorter time to response [31]. Moreover, Krieg et al. proposed that abundant circulating CD14⁺ CD16[−] HLA-DR^{hi} cells before anti-PD-1 therapy facilitate the infiltration of circulating T lymphocytes into the tumor, enhancing the cytotoxicity against cancer cells [32]. Earlier studies also reported that HLA-DR expression on tumor-infiltrating monocytes correlates with high levels of PD-L1 [33], suggesting that the increased PD-L1⁺ CD14⁺ cells found in R patients in our cohort may have these functional characteristics. On the other hand, PD-L1 expression on circulating monocytes has been associated with shorter survival in patients treated with anti-PD-1 therapy [34,35]. Apparent discrepancies may be attributed to the heterogeneity of the cohorts, PD-1 therapy, tumor type, and stage. Moreover, some studies analyzed levels of expression of PD-L1 whereas we analyzed percentages of PD-L1⁺ cells.

Neutrophils have largely been limited to the measurement of the blood neutrophil-to-lymphocyte ratio and an elevated ratio is associated with shorter OS and PFS in NSCLC patients treated with PD-(L)1 inhibitors [36]. However, in line with our findings, recent studies have focused on a subset of circulating low-density neutrophils with higher levels of PD-L1 (transcriptomic data) and mature phenotypes that mediate immunosuppression and may be the target of PD-(L)1 inhibitors [37]. In other types of cancer, results were more variable; in the case of melanoma patients, lower frequencies of PD-L1⁺ neutrophils were associated with better PFS [38]. Differences in the findings of this study with ours could be explained by the different tumor types, tumor stages, and types of PD-(L)1 inhibitor therapy. Further experiments need to be performed to better characterize PD-L1⁺ neutrophils phenotypically and functionally in our cohort.

There has been growing interest in exploring the potential predictive value of PD-L1 expression on PLTs in the context of response to PD-(L)1 inhibitors. In line with our findings, Colarusso et al. demonstrated that increased PD-L1 expression in PLTs correlated with a longer clinical benefit from anti-PD-L1 therapy in NSCLC patients [39]. Some studies have pointed to the transfer of PD-L1 protein from tumor cells to blood PLTs during their interaction in a fibronectin- and integrin $\alpha 5 \beta 1$ -dependent manner [24]. However, we did not find any correlation between PD-L1 expression by tumor cells and by PLTs. Zaslavsky et al. documented PD-L1 expression on circulating PLTs even in patients with PD-L1 negative tumors, further highlighting the complexity of PD-L1 dynamics within the tumor microenvironment [40]. Possible explanations for this contradiction may include (1) limitations in the measurement of PD-L1 expression in tumor biopsies, including sample quality and tumor heterogeneity; (2) PD-L1 expressed by PLTs may originate from their own expression and the transference from tumor cells. Interestingly, our findings reveal that PLTs are a major contributor to PD-L1 expression on leukocytes, irrespective of patients' response, as the percentages of PD-L1⁺ leukocytes were higher when PLTs were bound. Additionally, significant changes in the frequencies of PD-L1⁺ leukocytes were limited to populations with bound PLTs, and not in those without bound PLTs. This observation, combined with a similar kinetic profile of PD-L1⁺ PLTs and PD-L1⁺ myeloid cells, suggests that PD-(L)1 inhibitors specifically target PD-L1 derived from PLTs, even when they are bound to leukocytes, rather than PD-L1 from leukocytes themselves.

Lower plasma IL-17 concentration and its significant increase in responders, together with the identification of IL-17 as a risk factor in non-responders to anti-PD-(L)1 therapy, can help to understand the response to PD-(L)1 inhibitors. Notably, at baseline, R patients have lower IL-17 levels compared to SD patients but only show a trend toward lower levels than PD patients ($p = 0.1$). One plausible explanation for these findings is the line of ICI treatment. SD and R patients mainly undergo first- and second-line treatments, whereas PD patients predominantly receive second-line treatment. These treatment line variations may not only contribute to baseline differences but also influence the direction of IL-17 level changes (i.e., decrease/increase) within each group. Further investigations with a larger patient cohort are imperative to understand the impact of treatment lines. Our network

analysis also revealed an association of IFN- γ with IL-17 in PD patients but not in R patients. We additionally observed a positive association between IL-10 and PD-L1⁺ neutrophils in PD patients only. In line with these results, Zhang et al. reported that tumor-associated neutrophils secrete IL-10 to promote tumor progression and distant metastasis in lung cancer [41]. The negative association between IL-6R and the percentage of PD-L1⁺ CD14⁺ cells in PD and SD, but not in R patients, may be explained by the predominance of the IL-6 trans-signaling pathway. It is described that in cancer conditions, IL-6 enhances PD-L1 expression in monocytes [42] and IL-6 trans-signaling limits the classical pathway, resulting in increased angiogenesis, tumor growth, and metastasis [43]. Despite that we did not find differences in IL-6 among NSCLC patients classified according to anti-PD-(L)1 response, in other cancers, such as melanoma and breast cancer, IL-6 levels at baseline have been correlated with rapid disease progression [44,45].

Despite the relevance of our findings, our study has some limitations. First, we lost some patients during the follow-up, particularly among those who progressed to PD-(L)1 inhibitors, who discontinued treatment, experienced adverse effects, or passed away. Second, measuring PD-L1 on CD14⁺ cells or neutrophils alone is insufficient to determine the effectiveness of anti-PD-(L)1 treatment, since other factors such as tumor mutations and immune cell infiltration may also play significant roles in predicting treatment response. Third, the NSCLC cohort of patients included in our study was heterogeneous, also including patients receiving anti-PD-(L)1 treatment in combination with chemotherapy or other immune checkpoint inhibitors and in different treatment lines, which may have influenced our results. Extended research is needed to assess whether these results can be extrapolated to other lung cancer subtypes. Nevertheless, our findings suggest that PD-L1 expression on circulating cells, in addition to PD-L1 expression in tumors, is relevant to determining the response to PD-(L)1 inhibitors.

Although further investigation is necessary to fully elucidate their precise implications, our findings suggest the critical role of pre-existing immune landscapes and treatment-induced changes in PD-L1 expression on specific leukocyte populations. These factors could provide one of the mechanistic foundations for patient stratification and timely therapeutic decisions, ultimately enhancing the efficacy and cost-effectiveness of PD-(L)1 inhibitor treatments.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines12050958/s1>, Figure S1: flow cytometry gating strategy for measuring PD-L1 expression on leukocytes with or without bound platelets; Figure S2: kinetics of PD-L1⁺ NK cells and T lymphocytes in NSCLC patients based on anti-PD-(L)1 response; Table S1: model fitting information of the multinomial logistic regression.

Author Contributions: Conceptualization, G.A., M.M. (Maria Mulet), C.Z., S.V. and M.M. (Margarita Majem); methodology, M.M. (Maria Mulet), C.Z., R.O.-G. and E.C.; software, M.M. (Maria Mulet), C.Z. and R.O.-G.; validation, S.V. and M.M. (Margarita Majem); formal analysis, G.A., M.M. (Maria Mulet) and C.Z.; investigation, M.M. (Maria Mulet), C.Z. and R.O.-G.; resources, G.A., M.M. (Maria Mulet), C.Z., R.O.-G. and E.C.; data curation, G.A., M.M. (Maria Mulet), C.Z., A.B., I.S. and J.S.-L.; writing—original draft preparation, G.A., M.M. (Maria Mulet), S.V. and M.M. (Margarita Majem); writing—review and editing, G.A., M.M. (Maria Mulet), C.Z., R.O.-G., A.B., I.S., J.S.-L., E.C., S.V. and M.M. (Margarita Majem); visualization, M.M. (Maria Mulet), S.V. and M.M. (Margarita Majem); supervision, S.V. and M.M. (Margarita Majem); project administration, S.V. and M.M. (Margarita Majem); funding acquisition, S.V. and M.M. (Margarita Majem). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by Bristol Myers Squibb (OT123-316).

Institutional Review Board Statement: This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved on 13 December 2017 by the Research Ethics Board of Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (IIBSP-PDL-2017-82).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in this study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available from corresponding authors.

Acknowledgments: Silvia Vidal was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) and she is a participant in the Program for Stabilization of Investigators of the Direcció d'Estrategia i Coordinació del Departament de Salut, Generalitat de Catalunya. This work has been performed within Ph.D. Medicine Program of Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

Conflicts of Interest: The authors declare that this study received funding from Bristol Myers Squibb. The funder was not involved in the study design, collection, analysis, interpretation of data, the writing of this article or the decision to submit it for publication.

References

- Weinstock, M.; McDermott, D. Targeting PD-1/PD-L1 in the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Ther. Adv. Urol.* **2015**, *7*, 365–377. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Stenehjem, D.D.; Tran, D.; Nkrumah, M.A.; Gupta, S. PD1/PDL1 inhibitors for the treatment of advanced urothelial bladder cancer. *Onco Targets Ther.* **2018**, *11*, 5973–5989. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mirjagic Martinovic, K.; Vuletic, A.; Tisma Miletic, N.; Besu Zizak, I.; Milovanovic, J.; Matkovic, S.; Jurisic, V. Circulating cytokine dynamics as potential biomarker of response to anti-PD-1 immunotherapy in BRAFwt MM patients. *Transl. Oncol.* **2023**, *38*, 101799. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Borghaei, H.; Paz-Ares, L.; Horn, L.; Spigel, D.R.; Steins, M.; Ready, N.E.; Chow, L.Q.; Vokes, E.E.; Felip, E.; Holgado, E.; et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 1627–1639. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Brahmer, J.; Reckamp, K.L.; Baas, P.; Crino, L.; Eberhardt, W.E.; Poddubskaya, E.; Antonia, S.; Pluzanski, A.; Vokes, E.E.; Holgado, E.; et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 123–135. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Herbst, R.S.; Baas, P.; Kim, D.W.; Felip, E.; Perez-Gracia, J.L.; Han, J.Y.; Molina, J.; Kim, J.H.; Arvis, C.D.; Ahn, M.J.; et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. *Lancet* **2016**, *387*, 1540–1550. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Rittmeyer, A.; Barlesi, F.; Waterkamp, D.; Park, K.; Ciardiello, F.; von Pawel, J.; Gadgeel, S.M.; Hida, T.; Kowalski, D.M.; Dols, M.C.; et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): A phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet* **2017**, *389*, 255–265. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Reck, M.; Rodriguez-Abreu, D.; Robinson, A.G.; Hui, R.; Csoszi, T.; Fulop, A.; Gottfried, M.; Peled, N.; Tafreshi, A.; Cuffe, S.; et al. Five-Year Outcomes with Pembrolizumab versus Chemotherapy for Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer with PD-L1 Tumor Proportion Score $\geq 50\%$. *J. Clin. Oncol.* **2021**, *39*, 2339–2349. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Gandhi, L.; Rodriguez-Abreu, D.; Gadgeel, S.; Esteban, E.; Felip, E.; De Angelis, F.; Domine, M.; Clingan, P.; Hochmair, M.J.; Powell, S.F.; et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 2078–2092. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Paz-Ares, L.; Luft, A.; Vicente, D.; Tafreshi, A.; Gumus, M.; Mazieres, J.; Hermes, B.; Cay Senler, F.; Csoszi, T.; Fulop, A.; et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 2040–2051. [\[CrossRef\]](#)
- Socinski, M.A.; Jotte, R.M.; Cappuzzo, F.; Orlandi, F.; Stroyakovskiy, D.; Nogami, N.; Rodriguez-Abreu, D.; Moro-Sibilot, D.; Thomas, C.A.; Barlesi, F.; et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 2288–2301. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- West, H.; McCleod, M.; Hussein, M.; Morabito, A.; Rittmeyer, A.; Conter, H.J.; Kopp, H.G.; Daniel, D.; McCune, S.; Mekhail, T.; et al. Atezolizumab in combination with carboplatin plus nab-paclitaxel chemotherapy compared with chemotherapy alone as first-line treatment for metastatic non-squamous non-small-cell lung cancer (IMpower130): A multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2019**, *20*, 924–937. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hiltbrunner, S.; Cords, L.; Kasser, S.; Freiburger, S.N.; Kreutzer, S.; Toussaint, N.C.; Grob, L.; Opitz, I.; Messerli, M.; Zoche, M.; et al. Acquired resistance to anti-PD1 therapy in patients with NSCLC associates with immunosuppressive T cell phenotype. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 5154. [\[CrossRef\]](#)
- To, K.K.W.; Fong, W.; Cho, W.C.S. Immunotherapy in Treating EGFR-Mutant Lung Cancer: Current Challenges and New Strategies. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 635007. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hendriks, L.E.; Kerr, K.M.; Menis, J.; Mok, T.S.; Nestle, U.; Passaro, A.; Peters, S.; Planchard, D.; Smit, E.F.; Solomon, B.J.; et al. Non-oncogene-addicted metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **2023**, *34*, 358–376. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Aldea, M.; Benitez, J.C.; Mezquita, L. The Lung Immune Prognostic Index (LIPI) stratifies prognostic groups in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Transl. Lung Cancer Res.* **2020**, *9*, 967–970. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mezquita, L.; Auclin, E.; Ferrara, R.; Charrier, M.; Remon, J.; Planchard, D.; Ponce, S.; Ares, L.P.; Leroy, L.; Audigier-Valette, C.; et al. Association of the Lung Immune Prognostic Index with Immune Checkpoint Inhibitor Outcomes in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol.* **2018**, *4*, 351–357. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Beatty, G.L.; Gladney, W.L. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 687–692. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

19. Gong, J.; Chehrizi-Raffle, A.; Reddi, S.; Salgia, R. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: A comprehensive review of registration trials and future considerations. *J. Immunother. Cancer* **2018**, *6*, 8. [\[CrossRef\]](#)
20. Zamora Atenza, C.; Anguera, G.; Riudavets Melia, M.; Alserawan De Lamo, L.; Sullivan, I.; Barba Joaquin, A.; Serra Lopez, J.; Ortiz, M.A.; Mulet, M.; Vidal, S.; et al. The integration of systemic and tumor PD-L1 as a predictive biomarker of clinical outcomes in patients with advanced NSCLC treated with PD-(L)1blockade agents. *Cancer Immunol. Immunother.* **2022**, *71*, 1823–1835. [\[CrossRef\]](#)
21. Costantini, A.; Julie, C.; Dumenil, C.; Helias-Rodzewicz, Z.; Tisserand, J.; Dumoulin, J.; Giraud, V.; Labrune, S.; Chinet, T.; Emile, J.F.; et al. Predictive role of plasmatic biomarkers in advanced non-small cell lung cancer treated by nivolumab. *Oncoimmunology* **2018**, *7*, e1452581. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Zamora, C.; Riudavets, M.; Anguera, G.; Alserawan, L.; Sullivan, I.; Barba, A.; Serra, J.; Ortiz, M.A.; Gallardo, P.; Perea, L.; et al. Circulating leukocyte-platelet complexes as a predictive biomarker for the development of immune-related adverse events in advanced non-small cell lung cancer patients receiving anti-PD-(L)1 blocking agents. *Cancer Immunol. Immunother.* **2021**, *70*, 1691–1704. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Cho, M.S.; Lee, H.; Gonzalez-Delgado, R.; Li, D.; Sasano, T.; Carlos-Alcalde, W.; Ma, Q.; Liu, J.; Sood, A.K.; Afshar-Kharghan, V. Platelets Increase the Expression of PD-L1 in Ovarian Cancer. *Cancers* **2022**, *14*, 2498. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Hinterleitner, C.; Strahle, J.; Malenke, E.; Hinterleitner, M.; Henning, M.; Seehawer, M.; Bilich, T.; Heitmann, J.; Lutz, M.; Mattern, S.; et al. Platelet PD-L1 reflects collective intratumoral PD-L1 expression and predicts immunotherapy response in non-small cell lung cancer. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 7005. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Hwang, M.; Canzoniero, J.V.; Rosner, S.; Zhang, G.; White, J.R.; Belcaid, Z.; Cherry, C.; Balan, A.; Pereira, G.; Curry, A.; et al. Peripheral blood immune cell dynamics reflect antitumor immune responses and predict clinical response to immunotherapy. *J. Immunother. Cancer* **2022**, *10*, e004688. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Jurisic, V. Multiomic analysis of cytokines in immuno-oncology. *Expert. Rev. Proteom.* **2020**, *17*, 663–674. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Leme, D.E.d.C.; Alves, E.V.d.C.; Lemos, V.d.C.O.; Fattori, A. Network Analysis: A Multivariate Statistical Approach for Health Science Research. *Geriatr. Gerontol. Aging* **2020**, *14*, 43–51. [\[CrossRef\]](#)
28. Yang, R.; Sun, L.; Li, C.F.; Wang, Y.H.; Yao, J.; Li, H.; Yan, M.; Chang, W.C.; Hsu, J.M.; Cha, J.H.; et al. Galectin-9 interacts with PD-1 and TIM-3 to regulate T cell death and is a target for cancer immunotherapy. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 832. [\[CrossRef\]](#)
29. Oyama, R.; Kanayama, M.; Mori, M.; Matsumiya, H.; Taira, A.; Shinohara, S.; Takenaka, M.; Yoneda, K.; Kuroda, K.; Tanaka, F. CD155 expression and its clinical significance in non-small cell lung cancer. *Oncol. Lett.* **2022**, *23*, 166. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Pescia, C.; Pini, G.; Olmeda, E.; Ferrero, S.; Lopez, G. TIGIT in Lung Cancer: Potential Theranostic Implications. *Life* **2023**, *13*, 1050. [\[CrossRef\]](#)
31. Parikh, K.; Kumar, A.; Ahmed, J.; Anwar, A.; Puccio, C.; Chun, H.; Fanucchi, M.; Lim, S.H. Peripheral monocytes and neutrophils predict response to immune checkpoint inhibitors in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **2018**, *67*, 1365–1370. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Krieg, C.; Nowicka, M.; Guglietta, S.; Schindler, S.; Hartmann, F.J.; Weber, L.M.; Dummer, R.; Robinson, M.D.; Levesque, M.P.; Becher, B. High-dimensional single-cell analysis predicts response to anti-PD-1 immunotherapy. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 144–153. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Kuang, D.M.; Zhao, Q.; Peng, C.; Xu, J.; Zhang, J.P.; Wu, C.; Zheng, L. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J. Exp. Med.* **2009**, *206*, 1327–1337. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Riemann, D.; Schutte, W.; Turzer, S.; Seliger, B.; Moller, M. High PD-L1/CD274 Expression of Monocytes and Blood Dendritic Cells Is a Risk Factor in Lung Cancer Patients Undergoing Treatment with PD1 Inhibitor Therapy. *Cancers* **2020**, *12*, 2966. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Zhang, X.W.; Bi, X.W.; Liu, P.P.; Liu, Z.L.; Nie, M.; Yang, H.; Lei, D.X.; Xia, Y.; Jiang, W.Q.; Zeng, W.A. Expression of PD-L1 on Monocytes Is a Novel Predictor of Prognosis in Natural Killer/T-Cell Lymphoma. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 1360. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Jiang, T.; Bai, Y.; Zhou, F.; Li, W.; Gao, G.; Su, C.; Ren, S.; Chen, X.; Zhou, C. Clinical value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with non-small-cell lung cancer treated with PD-1/PD-L1 inhibitors. *Lung Cancer* **2019**, *130*, 76–83. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Vanhaver, C.; Aboubakar Nana, F.; Delhez, N.; Luyckx, M.; Hirsch, T.; Bayard, A.; Houbion, C.; Daugey, N.; Brochier, A.; van der Bruggen, P.; et al. Immunosuppressive low-density neutrophils in the blood of cancer patients display a mature phenotype. *Life Sci. Alliance* **2024**, *7*, e202302332. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Cristinziano, L.; Modestino, L.; Capone, M.; Madonna, G.; Mallardo, D.; Giannarelli, D.; D’Angelo, G.; Ferrara, A.L.; Loffredo, S.; Varricchi, G.; et al. PD-L1(+) neutrophils as novel biomarkers for stage IV melanoma patients treated with nivolumab. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 962669. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Colarusso, C.; Falanga, A.; Terlizzi, M.; De Rosa, I.; Somma, P.; Sommella, E.M.; Caponigro, V.; Panico, L.; Salviati, E.; Campiglia, P.; et al. High levels of PD-L1 on platelets of NSCLC patients contributes to the pharmacological activity of Atezolizumab. *Biomed. Pharmacother.* **2023**, *168*, 115709. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Zaslavsky, A.B.; Adams, M.P.; Cao, X.; Maj, T.; Choi, J.E.; Stangl-Kremser, J.; Patel, S.; Putelo, A.; Lee, S.K.; Nallandhighal, S.; et al. Platelet PD-L1 suppresses anti-cancer immune cell activity in PD-L1 negative tumors. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 19296. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

41. Zhang, S.; Sun, L.; Zuo, J.; Feng, D. Tumor associated neutrophils governs tumor progression through an IL-10/STAT3/PD-L1 feedback signaling loop in lung cancer. *Transl. Oncol.* **2024**, *40*, 101866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Zhang, W.; Liu, Y.; Yan, Z.; Yang, H.; Sun, W.; Yao, Y.; Chen, Y.; Jiang, R. IL-6 promotes PD-L1 expression in monocytes and macrophages by decreasing protein tyrosine phosphatase receptor type O expression in human hepatocellular carcinoma. *J. Immunother. Cancer* **2020**, *8*, e000285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Raskova, M.; Lacina, L.; Kejik, Z.; Venhauerova, A.; Skalickova, M.; Kolar, M.; Jakubek, M.; Rosel, D.; Smetana, K., Jr.; Brabek, J. The Role of IL-6 in Cancer Cell Invasiveness and Metastasis-Overview and Therapeutic Opportunities. *Cells* **2022**, *11*, 3698. [[CrossRef](#)]
44. Mirjagic Martinovic, K.; Vuletic, A.; Tisma Miletic, N.; Matkovic, S.; Gavrilovic, D.; Ninkovic, A.; Jurisic, V.; Babovic, N. Circulating IL-6 is associated with disease progression in BRAFwt metastatic melanoma patients receiving anti-PD-1 therapy. *J. Clin. Pathol.* **2024**, *77*, 343–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Chen, J.; Wei, Y.; Yang, W.; Huang, Q.; Chen, Y.; Zeng, K.; Chen, J. IL-6: The Link between Inflammation, Immunity and Breast Cancer. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 903800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

5. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS

Los dos trabajos tienen por objetivo demostrar que además de la expresión de PD-L1 tumoral, existen otras fuentes de PD-L1 que pueden explicar la respuesta a fármacos anti-PD-(L)1 en pacientes con CPCNP avanzado, como es la expresión de PD-L1 en células circulantes inmunes (linfocitos CD4+, linfocitos CD8+, NK, monocitos, neutrófilos), PLTs, y también el sPD-L1.

El **primer trabajo** es un estudio prospectivo en el que se analizaron muestras sanguíneas de 119 pacientes con CPCNP avanzado, tratados con fármacos inhibidores de PD-(L)1 a fin de determinar si la expresión de PD-L1 en las distintas subpoblaciones de células del sistema inmunitario, PLTs y PMPs además de la concentración plasmática del sPD-L1, se correlacionaba con eficacia en términos de SLP y SG.

La mayoría de los pacientes fueron tratados en monoterapia con fármacos anti-PD-(L)1 (104 pacientes) y otros en combinación (15 pacientes). La histología más común fue la no escamosa (61,3%). La expresión de PD-L1 fue < 1% en 30 pacientes (25,2%), entre 1–49% en 35 (29,4%), ≥ 50% en 37 (31,1%) y no evaluable en 17 (14,3%). Treinta y siete pacientes (31,1%) recibieron inhibidores de PD-(L)1 como tratamiento de primera línea y 82 (68,9%) como tratamiento de segunda línea o posterior.

Las muestras se analizaron por citometría de flujo y los resultados fueron comparados con los de las muestras de 29 donantes sanos. También se midieron los niveles plasmáticos de PD-L1 soluble (sPD-L1) en 118 pacientes mediante un ensayo ELISA. La expresión de PD-L1 en las células tumorales se evaluó por IHC, categorizando los niveles en negativos, bajos o altos según el puntaje de proporción tumoral (TPS).

En el trabajo se demostró que, en los pacientes con CPCNP avanzado, los porcentajes de las subpoblaciones circulantes de leucocitos, PLTs y PMPs con expresión de PD-L1 así como los niveles plasmáticos (sPD-L1), eran independientes de la expresión de PD-L1 en el tumor.

Además, en comparación con los donantes sanos, en los pacientes con CPCNP se detectó que las distintas subpoblaciones de leucocitos circulantes + (linfocitos T CD4+ y CD8+, células NK, monocitos y neutrófilos), PLTs y PMPs presentaban mayor expresión de PD-L1. También se observaron niveles más altos de sPD-L1 en plasma en los pacientes. Sin embargo, no se observaron diferencias en los porcentajes de las subpoblaciones PD-

L1 (que indicaremos como PD-L1+ a partir de ahora) circulantes al separar a los pacientes con CPCNP según la expresión de PD-L1 en el tumor, lo que sugiere que la expresión sistémica y tumoral de PD-L1 son variables independientes.

En cuanto a las SLP, se observó que los pacientes con porcentajes más altos de monocitos, neutrófilos, PLTs y PMPs PD-L1+ obtuvieron una SLP mayor. No se observó ninguna correlación entre la SLP y los porcentajes de linfocitos PD-L1+ (CD4+, CD8+ o NK) ni los niveles de sPD-L1, ni tampoco según la expresión de PD-L1 en el tumor. Estos resultados se observaron tanto en los pacientes que recibieron el anti-PD-(L)1 en monoterapia como los que lo recibieron en combinación.

Con respecto a la SG, los pacientes con un porcentaje alto de monocitos PD-L1+ y una expresión tumoral de PD-L1 alta tuvieron una mediana de SG mayor, y se observó una tendencia a una mayor SG en el grupo de pacientes con porcentajes altos de neutrófilos y PMPs PD-L1+. Nuevamente, se observaron resultados similares tanto en los pacientes tratados con anti-PD-(L)1 en monoterapia como en combinación.

Se realizó un modelo de regresión de Cox univariado y multivariado, para determinar el efecto de las diferentes fuentes de PD-L1 sobre la SLP y SG. Los porcentajes altos de monocitos, neutrófilos y PMPs PD-L1+ fueron predictores de SLP en pacientes con CPCNP avanzado que recibieron inmunoterapia en el modelo univariado, pero en el multivariado solo los porcentajes altos de monocitos y PMPs PD-L1+ fueron variables independientes para predecir la SLP. Como predictores de SG en el análisis univariado de Cox destacaron los porcentajes altos de monocitos, neutrófilos PD-L1+ y la expresión tumoral de PD-L1 alta, mientras que los porcentajes altos de monocitos PD-L1+ y la expresión tumoral alta de PD-L1 fueron variables independientes para predecir la SG en el modelo multivariado de regresión de Cox.

A continuación, se realizó una integración de los datos de PD-L1 circulante y tumoral para predecir los resultados clínicos en pacientes que recibieron anti-PD-(L)1, que denominamos IPD (del inglés, *Integrated PD-L1 data*). Primero, se realizó un análisis en 70 pacientes con todos los datos de PD-L1 circulante y tumoral a través de una curva ROC, comparando pacientes con progresión de la enfermedad (PE) frente a los pacientes sin PE tras el tratamiento con inhibidores de PD-(L)1, para generar un punto de corte. El

área bajo la curva (AUC) fue 0,8 y el punto de corte fue 154,1. Se observó que los pacientes con $IPD \geq 154,1$ tenían una mediana de SLP significativamente superior que aquellos con $IPD < 154,1$: mediana de SLP no alcanzada frente a 4,33 meses (HR 0,29; IC del 95%: 0,16–0,54, $p < 0,0001$). De manera similar, la mediana de SG fue significativamente superior en pacientes con $IPD \geq 154,1$: mediana de SG no alcanzada vs 11,6 meses (HR 0,28; IC del 95%: 0,14–0,54, $p = 0,0002$). Dado que un porcentaje alto de monocitos PD-L1+ y alta expresión tumoral de PD-L1 fueron variables independientes en el análisis multivariado para predecir la SG, analizamos la combinación de ambas variables a través del cálculo de la curva ROC obteniendo un punto de corte de 83,85. Los pacientes con $IPD \geq 83,85$ tenían una mediana de SLP significativamente superior que aquellos con $IPD < 83,85$: mediana de SLP no alcanzada vs 4,27 meses (HR 0,41; IC del 95%: 0,23–0,75, $p = 0,0041$). Los pacientes con $IPD \geq 83,85$ también tuvieron una mediana de SG significativamente superior: mediana de SG no alcanzada vs 11,44 meses (HR 0,32; IC del 95%: 0,17–0,62, $p = 0,0041$).

Finalmente, se analizó la capacidad para predecir la SLP y SG del IPD de todas las fuentes de PD-L1 circulante (el punto de corte fue 105, calculado por la curva ROC). Se observó que los pacientes con $IPD \geq 105$ tenían una mediana de SLP más larga que aquellos con $IPD < 105$: mediana SLP no alcanzada vs 4,0 meses (HR 0,21; IC del 95%: 0,11–0,4, $p < 0,0001$). También se observó una mediana de SG superior en los pacientes con $IPD \geq 105$: mediana de SG no alcanzada vs 9,23 meses (HR 0,38; IC del 95%: 0,2–0,73, $p = 0,0041$).

Por último, se realizó un modelo de regresión de Cox multivariado para analizar las variables clínicas junto con todos los datos de PD-L1 circulante y tumoral, y su relación con la SG y SLP. Se observó que un porcentaje alto de monocitos PD-L1+ fue la variable más fuerte, seguida por el ECOG PS, para los resultados de SG.

El **segundo trabajo** es un estudio prospectivo en el que se analizan muestras sanguíneas de 113 pacientes con CPCNP avanzado durante el tratamiento con fármacos inhibidores de PD-(L)1 a fin de determinar sus cambios durante el tratamiento en función de la respuesta radiológica. Las muestras de sangre se recogieron previo al inicio del tratamiento anti-PD-(L)1 (t=0) y posteriormente, cada 4–6 semanas hasta las 22–24 semanas (t=4–6 s, t=10–12 s, t=16–18 s, t=22–24 s). Los pacientes se clasificaron en tres grupos según la respuesta radiológica presentada en la evaluación radiológica a las 10-12 semanas según criterios RECIST v1.1 (del inglés, *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*): PE, enfermedad estable (EE) y respondedores (R). Los respondedores se subdividieron en respuesta parcial (RP) y respuesta completa (RC).

En cuanto a las características clínico-patológicas de los pacientes, el 77% de ellos eran varones, la edad mediana fue de 65 años, siendo fumadores o exfumadores (90,3%). La histología no escamosa fue la más frecuente (71%). La expresión de PD-L1 tumoral se evaluó en el 85% de los pacientes, y el PD-L1 fue negativo (<1%) en el 28,1% de los pacientes, bajo (1–49%) en el 33,3% y alto ($\geq 50\%$) en el 38,6%. El tratamiento con anti-PD-(L)1 fue administrado en primera línea en el 32,7% de los pacientes, en segunda línea en el 53,1% y de tercera línea o posterior en el 14,2%. La mayoría de los pacientes recibieron inhibidores de PD-(L)1 en monoterapia (86,8%). La respuesta radiológica tras 10–12 semanas de tratamiento fue PE en el 48,7% de los pacientes, EE en el 21,2%, RP en el 26,5%, y RC en el 3,6% de los pacientes.

Se observaron diferencias significativas en las frecuencias de pacientes clasificadas según los tipos de histología tumoral ($\chi^2 = 11,7$; $p = 0,003$), siendo la mayoría de los pacientes respondedores de histología escamosa, mientras que la histología no escamosa fue predominante en los pacientes con enfermedad estable y progresión. Sin embargo, la expresión de PD-L1 tumoral no se asoció con la respuesta al tratamiento con anti-PD-(L)1.

En cuanto al análisis de sangre periférica, el grupo de pacientes R y EE mostraron porcentajes más altos de monocitos circulantes con expresión positiva de PD-L1 antes de la primera administración de anti-PD-(L)1 que el grupo de pacientes PE.

Se observó que, antes del inicio del tratamiento, el grupo de pacientes R tuvieron porcentajes más altos de neutrófilos PD-L1+ en comparación con el grupo de pacientes PE. En cuanto a la línea linfoide, el grupo de pacientes PE presentaron porcentajes más altos de linfocitos T CD4+ PD-L1+ en comparación con el grupo de pacientes EE, y el grupo de pacientes R mostraron porcentajes más altos de linfocitos T CD8+ PD-L1+.

Los porcentajes de PLTs PD-L1+ fueron significativamente más altos en el grupo de pacientes R en comparación con el grupo de pacientes PE.

También se evidenció una correlación positiva con los porcentajes de neutrófilos PD-L1+ y PLTs PD-L1+ y los porcentajes altos de monocitos PD-L1+. No se observó ninguna correlación entre las subpoblaciones de leucocitos PD-L1 + y la expresión de PD-L1 tumoral. Otras fuentes de PD-L1, en particular el sPD-L1, no mostraron diferencias significativas según los grupos de respuesta.

Durante el tratamiento, se observó una disminución significativa en los porcentajes de monocitos y neutrófilos PD-L1+ tras las primeras 4–6 semanas de tratamiento en el grupo de pacientes R, pero no en los otros grupos de pacientes. También se evidenció una disminución significativa en el porcentaje de monocitos PD-L1+ entre el inicio del tratamiento y las semanas 22–24 en el grupo de pacientes R.

Observamos una tendencia a la disminución del porcentaje de PLTs PD-L1+ circulantes tras las primeras 4–6 semanas de tratamiento en los pacientes R.

En cuanto a las células NK, linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+, no se observaron cambios significativos en la expresión de PD-L1 durante el tratamiento.

Por otro lado, en el grupo de pacientes con PE se observó un aumento en la proporción de monocitos, neutrófilos y PLTs PD-L1+ en las 4-6 primeras semanas tras el inicio de tratamiento. No se observaron diferencias en los porcentajes de linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8 + PD-L1+ entre los grupos de respuesta durante este período.

Se analizaron diferentes escenarios para explicar las diferencias en los porcentajes de monocitos y neutrófilos PD-L1+ observadas en nuestra cohorte de pacientes, considerando las PLTs como potencial fuente de PD-L1. Por tanto, se consideraron 3 posibles opciones: que existieran un mayor porcentaje de complejos de leucocitos unidos

a PLTs PD-L1+, que la expresión de PD-L1 viniera aportada principalmente por la plaqueta unida o por el contrario por el propio leucocito.

No se observaron diferencias significativas en las respuestas cuando se consideraba el porcentaje de complejo leucocito-plaqueta ni antes de comenzar el anti-PD-(L)1 ni durante las 24 semanas siguientes entre los grupos de respuestas.

En segundo lugar, se comparó la expresión de PD-L1 en los distintos leucocitos con o sin PLTs unidas para determinar la proporción de PD-L1 que era intrínseca de los leucocitos. El porcentaje de monocitos y neutrófilos PD-L1+ sin PLTs unidas disminuyó después de 22–24 semanas de tratamiento, pero solo en los pacientes PE. También se observó que el porcentaje de monocitos PD-L1+ antes del tratamiento, con y sin PLTs unidas, fue significativamente menor en los pacientes PE que en los pacientes EE y R.

Con respecto a la concentración de factores inmunomoduladores solubles en plasma antes del inicio del tratamiento, se observaron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de IL-17 entre el grupo de pacientes EE y R al inicio del tratamiento. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de IFN- γ , IL-10, IL-6 ni en las concentraciones de IL-6R. La concentración de IL-17 en plasma aumentó en el grupo de pacientes R después de 10–12 semanas de tratamiento con anti-PD-(L)1 y hubo una tendencia al descenso en el grupo de pacientes EE.

Con estos resultados, se realizó un análisis de redes de todos los resultados para ver el patrón de asociación y visualizar las posibles interacciones entre las poblaciones de leucocitos PD-L1+ y las citocinas plasmáticas en pacientes con CPCNP clasificados según su respuesta al tratamiento con anti-PD-(L)1.

Tras 10–12 semanas de tratamiento con anti-PD-(L)1, el porcentaje de células T CD8+ PD-L1+ mostró la mayor y más fuerte asociación en el grupo de pacientes R. Además, las concentraciones plasmáticas de sIL-6R también se presentaron una mayor asociación en el grupo de pacientes R y EE en comparación con el grupo de pacientes PD.

Para evaluar la contribución de cada variable evaluada en la predicción de la respuesta a la terapia anti-PD-L1, se realizó un modelo de regresión logística multinomial multivariado. Un mayor porcentaje de monocitos PD-L1+ sin PLTs unidas se consideró un

factor protector, lo que aumentaba significativamente la probabilidad de responder a la terapia anti-PD-(L)1. El porcentaje de neutrófilos PD-L1+ también se identificó como un factor protector. Por el contrario, concentraciones más altas de IL-17 se consideraron un factor de riesgo, disminuyendo la probabilidad de responder a la terapia.

Cabe destacar que la proporción de monocitos PD-L1+ / IL-17 antes del tratamiento fue significativamente mayor en el grupo de pacientes R en comparación con el grupo de pacientes PE, y tendió a ser mayor en comparación con el grupo de pacientes EE.

6. RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial, y dentro de las neoplasias malignas pulmonares, el CPCNP es el subtipo más frecuente. En los últimos años, el tratamiento de CPCNP avanzado ha experimentado una transformación significativa con la introducción de ICIs. Aunque estos tratamientos han mejorado las tasas de supervivencia en comparación con la QT tradicional, no todos los pacientes se benefician de manera uniforme. En este contexto, el presente estudio se centró en la identificación de biomarcadores predictivos, particularmente en la expresión de PD-L1 en células circulantes y su relación con la respuesta a los inhibidores de PD-(L)1 en pacientes con CPCNP avanzado.

Los resultados del **primer artículo** demuestran que, los pacientes con CPCNP avanzado presentaron niveles de expresión elevados de PD-L1 en diversas poblaciones celulares circulantes, incluyendo leucocitos, PLTs, PMPs, así como sPD-L1 en plasma, en comparación con donantes sanos. Este hallazgo respalda la hipótesis de que las fuentes circulantes de PD-L1 podrían desempeñar un papel en la respuesta a los inhibidores de PD-(L)1.

En relación con la eficacia de los fármacos anti-PD-(L)1 en pacientes con CPCNP avanzado, encontramos que un mayor porcentaje de células mieloides PD-L1+, PLTs PD-L1+ y PMPs PD-L1+ antes del inicio del tratamiento se correlacionaba con una mejor SLP y SG, sin correlación entre estas fuentes circulantes y la expresión tumoral de PD-L1. Este hallazgo subraya la importancia potencial de integrar fuentes sistémicas y tumorales de PD-L1 como biomarcadores predictivos.

Una de las principales limitaciones de la expresión de PD-L1 en tejido tumoral como biomarcador es tener una capacidad predictiva imperfecta, como ya se ha comentado con anterioridad. En este sentido, la expresión de PD-L1 en células circulantes, especialmente en la línea mieloide, podría complementar la evaluación tumoral, mejorando así la capacidad de estratificación de los pacientes según el beneficio que pueden obtener del tratamiento con inhibidores de PD-(L)1. En particular, aquellos pacientes con un mayor porcentaje de neutrófilos PD-L1+ y monocitos PD-L1+ mostraron una supervivencia significativamente prolongada con el tratamiento anti-PD-(L)1. Esto coincide con estudios previos que relacionan una mayor expresión de PD-L1 en células mieloides con una mejor respuesta a los anti-PD(L)1.

Es importante destacar que nuestro estudio es el primero en reportar la expresión de PD-L1 en PLTs y PMPs de pacientes con CPCNP avanzado. Las PLTs pueden desempeñar un papel dual en la respuesta inmunitaria, modulando tanto la inflamación como la inmunosupresión. Nuestros hallazgos sugieren que un mayor porcentaje de expresión de PD-L1+ en PLTs y PMPs se asocia con una SLP mayor en pacientes tratados con inhibidores de PD-(L)1. Estos resultados apoyan la idea de que las PLTs, además de su rol tradicional en la hemostasia, podrían actuar como mediadoras clave en la interacción entre las células tumorales y el sistema inmunológico, influenciando así en la eficacia del tratamiento.

En cuanto a la línea linfoide, no se observaron diferencias significativas en la SLP según los niveles basales de CD4+, CD8+ o células NK con expresión positiva de PD-L1. A diferencia de estudios previos en melanoma, que sugerían una correlación entre la expresión de PD-L1 en linfocitos T y la supervivencia, nuestros resultados indican que, en CPCNP avanzado, las células linfoides con expresión de PD-L1 no tendrían un papel predictivo. Esto podría estar relacionado con el entorno inmunosupresor específico del CPCNP, donde las células mieloides supresoras y las células T reguladoras PD-L1+ podrían ejercer un control más fuerte sobre la respuesta inmunitaria antitumoral que los linfocitos PD-L1+.

El análisis de sPD-L1 no mostró correlación con la respuesta al tratamiento con anti-PD-(L)1, en línea con estudios previos que han reportado resultados contradictorios sobre el papel de sPD-L1 como biomarcador predictivo. Si bien algunos estudios sugieren que niveles bajos de sPD-L1 podrían correlacionarse con una mejor supervivencia, nuestros datos no apoyan esta hipótesis. Este resultado refuerza la complejidad de utilizar sPD-L1 como un biomarcador fiable, probablemente debido a su rápida liberación y posible heterogeneidad en su fuente de producción.

Los resultados del **segundo artículo**, centrado en la dinámica de los biomarcadores en sangre a lo largo del tratamiento, mostró que una disminución significativa en los porcentajes de monocitos y neutrófilos PD-L1+ después de las primeras 4-6 semanas de tratamiento con anti-PD(L)1 se asoció con mejores tasas de respuesta radiológica. Este hallazgo sugiere que cambios tempranos en las células mieloides podrían predecir la respuesta a estos tratamientos, proporcionando una herramienta adicional para monitorizar la eficacia del tratamiento en etapas tempranas.

Finalmente, nuestros hallazgos sobre las citocinas IL-17, IL-10 e IL-6R proporcionan una información valiosa sobre el microambiente tumoral y su interacción con el sistema inmunológico. La asociación de IL-10 con neutrófilos PD-L1+ en pacientes con progresión de la enfermedad refuerza el papel inmunosupresor de los neutrófilos en CPCNP avanzado. Asimismo, la correlación negativa entre IL-6R y monocitos que expresan PD-L1 en pacientes con enfermedad estable y paciente con progresión indica que la trans-señalización de IL-6 podría influir en la progresión tumoral y la respuesta a inhibidores de PD-(L)1.

Este estudio tiene algunas limitaciones. Si bien el tamaño de la muestra es considerable, contar con una cohorte más amplia y con un seguimiento más prolongado permitiría validar los resultados. Además, la heterogeneidad de los pacientes incluidos, que recibieron tratamiento con inhibidores de PD-1 y PD-L1 en diferentes líneas de tratamiento y/o en combinación con otros fármacos, podría haber influido en los resultados. No obstante, nuestros hallazgos sugieren que la integración de biomarcadores sistémicos, como la expresión de PD-L1 en células mieloides, PLTs y PMPs, junto con la expresión tumoral de PD-L1, podría ofrecer una mejor predicción de la respuesta a los inhibidores de PD-(L)1 en pacientes con CPCNP avanzado.

El enfoque integral que proponemos permitiría identificar mejor a aquellos pacientes que presentaran mayor beneficio de los agentes bloqueadores de PD-(L)1, de manera que esto ayude a la toma de decisiones terapéuticas.

7. CONCLUSIONES

1. Los pacientes con CPCNP avanzado presentan niveles de expresión elevados de PD-L1 en diversas poblaciones celulares circulantes, incluyendo leucocitos, plaquetas, micropartículas plaquetarias, así como PD-L1 soluble en plasma, en comparación con donantes sanos. Estas fuentes circulantes de PD-L1 podrían desempeñar un papel en la respuesta a los inhibidores de PD-(L)1.
2. En pacientes con CPCNP avanzado tratados con fármacos anti-PD-(L)1, un mayor porcentaje monocitos, neutrófilos, plaquetas y micropartículas plaquetarias con expresión positiva de PD-L1 antes del inicio del tratamiento se correlacionaba con una mejor supervivencia libre de progresión.
3. Los pacientes con CPCNP avanzado con un porcentaje alto de monocitos con expresión de PD-L1 pretratamiento y una expresión tumoral de PD-L1 alta obtienen un mayor beneficio cuando son tratados con inhibidores de PD-(L)1 en términos de supervivencia global. La integración de fuentes sistémicas y tumorales de expresión de PD-L1, podría ofrecer una mejor predicción de la respuesta a los anti-PD(L)1 en pacientes con CPCNP avanzado.
4. Tras tratamiento con inhibidores de PD-(L)1, se producen cambios en la expresión de PD-L1 en las células circulantes. Una disminución significativa en los porcentajes de monocitos y neutrófilos con expresión de PD-L1 después de las primeras 4-6 semanas de tratamiento se asocia con mejores tasas de respuesta radiológicas, mientras que los pacientes con progresión de la enfermedad muestran aumentos en estos porcentajes.
5. El aumento en la producción de IL-17 durante el tratamiento, se asocia a una mejor respuesta a anti-PD(L)1.
6. Un modelo de regresión multinomial indicó que una mayor proporción de monocitos con expresión positiva de PD-L1 y IL-17 al inicio del tratamiento se asocia con una mayor probabilidad de respuesta.

8. LINEAS DE FUTURO

Teniendo en cuenta los resultados y conclusiones obtenidos en esta tesis doctoral, se plantea la siguiente línea de investigación:

- 1. Estudio de la expresión basal de PD-L1 en población leucocitaria circulante y su relación con la eficacia y la toxicidad, en pacientes diagnosticados de carcinoma de células pequeñas metastásico tratados con anti-PD-(L)1 en primera línea.**

Después de los resultados obtenidos del estudio de la expresión de PD-L1 en de poblaciones leucocitarias en pacientes tratados con anti- PD-(L)1 en pacientes con CPCNP avanzado, presentados en la actual tesis doctoral, el equipo de Inmunología y de Oncología médica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau está estudiado esta posible relación de expresión de PD-L1 en población leucocitaria en pacientes diagnosticados de Carcinoma pulmonar de célula pequeña metastásico tratados en primera línea con anti-PD-(L)1 y su relación con los resultados de eficacia y el desarrollo de toxicidad inmunomediada.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024;74(3):229-63.
2. Nota de Prensa: Estadística de Defunciones según la Causa de Muerte. Año 2023. Datos provisionales. [Internet]. INE. [citado 2 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://www.ine.es/dyngs/Prensa/pEDCM2023.htm>
3. REDECAN. Estimaciones de la incidencia del cancer en españa 2024 [Internet]. 2024. Disponible en: <https://redecana.org/storage/documents/09a96a55-6939-419d-ba3e-202d7ae76e1d.pdf>
4. Gregory J. Riely, Douglas E. Wood, Dara L. Aisner. Early and Locally Advanced Non-Small Cell Lung Cancer [Internet]. [citado 2 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://www.nccn.org/patients/guidelines/content/PDF/lung-early-stage-patient.pdf>
5. Secretan B, Straif K, Baan R, Grosse Y, El Ghissassi F, Bouvard V, et al. A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *Lancet Oncol*. noviembre de 2009;10(11):1033-4.
6. Remon J, Reguart N, García-Campelo R, Conde E, Lucena CM, Persiva O, et al. Lung Cancer in Spain. *J Thorac Oncol*. 1 de febrero de 2021;16(2):197-204.
7. WHO Handbook on Indoor Radon: A Public Health Perspective [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2009 [citado 2 de octubre de 2024]. (WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK143216/>
8. Nielsen LS, Bælum J, Rasmussen J, Dahl S, Olsen KE, Albin M, et al. Occupational asbestos exposure and lung cancer--a systematic review of the literature. *Arch Environ Occup Health*. 2014;69(4):191-206.
9. Miller AB, Altenburg HP, Bueno-de-Mesquita B, Boshuizen HC, Agudo A, Berrino F, et al. Fruits and vegetables and lung cancer: Findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer*. 10 de enero de 2004;108(2):269-76.
10. Shekelle RB, Tangney CC, Rossof AH, Stamler J. Serum cholesterol, beta-carotene, and risk of lung cancer. *Epidemiol Camb Mass*. julio de 1992;3(4):282-7.
11. Foulkes WD. Inherited susceptibility to common cancers. *N Engl J Med*. 13 de noviembre de 2008;359(20):2143-53.
12. Hendriks LE, Kerr KM, Menis J, Mok TS, Nestle U, Passaro A, et al. Non-oncogene-addicted metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. abril de 2023;34(4):358-76.

13. Kim J, Lee H, Huang BW. Lung Cancer: Diagnosis, Treatment Principles, and Screening. *Am Fam Physician*. 1 de mayo de 2022;105(5):487-94.
14. Buccheri G, Ferrigno D. Lung cancer: clinical presentation and specialist referral time. *Eur Respir J*. diciembre de 2004;24(6):898-904.
15. Rivera MP, Mehta AC, Wahidi MM. Establishing the diagnosis of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. mayo de 2013;143(5 Suppl):e142S-e165S.
16. Torrego A, Majem M, Pallarés C. Protocolos y Procedimientos Del Servicio de Neumología Del Hospital de La Santa Creu i Sant Pau. 2º Edicion. Ediciones ERGON; 2015.
17. Herth FJF, Eberhardt R, Vilmann P, Krasnik M, Ernst A. Real-time endobronchial ultrasound guided transbronchial needle aspiration for sampling mediastinal lymph nodes. *Thorax*. septiembre de 2006;61(9):795-8.
18. Lemaire A, Nikolic I, Petersen T, Haney JC, Toloza EM, Harpole DH, et al. Nine-year single center experience with cervical mediastinoscopy: complications and false negative rate. *Ann Thorac Surg*. octubre de 2006;82(4):1185-9; discussion 1189-1190.
19. Detterbeck FC. The eighth edition TNM stage classification for lung cancer: What does it mean on main street? *J Thorac Cardiovasc Surg*. enero de 2018;155(1):356-9.
20. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WEE, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. enero de 2016;11(1):39-51.
21. Detterbeck FC, Woodard GA, Bader AS, Dacic S, Grant MJ, Park HS, et al. The Proposed 9th Edition TNM Classification of Lung Cancer. *Chest*. 15 de junio de 2024;S0012-3692(24)00706-2.
22. Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, Borczuk AC, Brambilla E, Cooper WA, et al. The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. marzo de 2022;17(3):362-87.
23. Majem M, Juan O, Insa A, Reguart N, Trigo JM, Carcereny E, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018). *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex*. enero de 2019;21(1):3-17.
24. Cagle PT, Allen TC, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Borczuk AC, et al., editores. *Precision Molecular Pathology of Lung Cancer* [Internet]. Cham: Springer

International Publishing; 2018 [citado 2 de octubre de 2024]. (Molecular Pathology Library). Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-62941-4>

25. Hasleton P, Flieder DB. Spencer's Pathology of the Lung. 6th Edition. 2014.
26. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 28 de junio de 2012;366(26):2443-54.
27. Read WL, Page NC, Tierney RM, Piccirillo JF, Govindan R. The epidemiology of bronchioloalveolar carcinoma over the past two decades: analysis of the SEER database. *Lung Cancer Amst Neth*. agosto de 2004;45(2):137-42.
28. Billingham LJ, Cullen MH. The benefits of chemotherapy in patient subgroups with unresectable non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. diciembre de 2001;12(12):1671-5.
29. Guo NL, Tosun K, Horn K. Impact and interactions between smoking and traditional prognostic factors in lung cancer progression. *Lung Cancer Amst Neth*. diciembre de 2009;66(3):386-92.
30. Nakamura H, Ando K, Shinmyo T, Morita K, Mochizuki A, Kurimoto N, et al. Female gender is an independent prognostic factor in non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. *Ann Thorac Cardiovasc Surg Off J Assoc Thorac Cardiovasc Surg Asia*. 2011;17(5):469-80.
31. El-Sherif A, Gooding WE, Santos R, Pettiford B, Ferson PF, Fernando HC, et al. Outcomes of sublobar resection versus lobectomy for stage I non-small cell lung cancer: a 13-year analysis. *Ann Thorac Surg*. agosto de 2006;82(2):408-15; discussion 415-416.
32. Blackmon SH, Cooke DT, Whyte R, Miller D, Cerfolio R, Farjah F, et al. The Society of Thoracic Surgeons Expert Consensus Statement: A Tool Kit to Assist Thoracic Surgeons Seeking Privileging to Use New Technology and Perform Advanced Procedures in General Thoracic Surgery. *Ann Thorac Surg*. marzo de 2016;101(3):1230-7.
33. Altorki N, Wang X, Kozono D, Watt C, Landrenau R, Wigle D, et al. Lobar or Sublobar Resection for Peripheral Stage IA Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 9 de febrero de 2023;388(6):489-98.
34. Scott WJ, Allen MS, Darling G, Meyers B, Decker PA, Putnam JB, et al. Video-assisted thoracic surgery versus open lobectomy for lung cancer: a secondary analysis of data from the American College of Surgeons Oncology Group Z0030 randomized clinical trial. *J Thorac Cardiovasc Surg*. abril de 2010;139(4):976-81; discussion 981-983.

35. Yan TD, Black D, Bannon PG, McCaughan BC. Systematic review and meta-analysis of randomized and nonrandomized trials on safety and efficacy of video-assisted thoracic surgery lobectomy for early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de mayo de 2009;27(15):2553-62.
36. Whitson BA, Groth SS, Duval SJ, Swanson SJ, Maddaus MA. Surgery for early-stage non-small cell lung cancer: a systematic review of the video-assisted thoracoscopic surgery versus thoracotomy approaches to lobectomy. *Ann Thorac Surg*. diciembre de 2008;86(6):2008-16; discussion 2016-2018.
37. Paul S, Altorki NK, Sheng S, Lee PC, Harpole DH, Onaitis MW, et al. Thoracoscopic lobectomy is associated with lower morbidity than open lobectomy: a propensity-matched analysis from the STS database. *J Thorac Cardiovasc Surg*. febrero de 2010;139(2):366-78.
38. Boffa DJ, Kosinski AS, Paul S, Mitchell JD, Onaitis M. Lymph node evaluation by open or video-assisted approaches in 11,500 anatomic lung cancer resections. *Ann Thorac Surg*. agosto de 2012;94(2):347-53; discussion 353.
39. Paul S, Isaacs AJ, Treasure T, Altorki NK, Sedrakyan A. Long term survival with thoracoscopic versus open lobectomy: propensity matched comparative analysis using SEER-Medicare database. *BMJ*. 2 de octubre de 2014;349:g5575.
40. Videtic GMM, Donington J, Giuliani M, Heinzerling J, Karas TZ, Kelsey CR, et al. Stereotactic body radiation therapy for early-stage non-small cell lung cancer: Executive Summary of an ASTRO Evidence-Based Guideline. *Pract Radiat Oncol*. 2017;7(5):295-301.
41. Bradley JD, Paulus R, Graham MV, Ettinger DS, Johnstone DW, Pilepich MV, et al. Phase II trial of postoperative adjuvant paclitaxel/carboplatin and thoracic radiotherapy in resected stage II and IIIA non-small-cell lung cancer: promising long-term results of the Radiation Therapy Oncology Group--RTOG 9705. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de mayo de 2005;23(15):3480-7.
42. Keller SM, Adak S, Wagner H, Herskovic A, Komaki R, Brooks BJ, et al. A randomized trial of postoperative adjuvant therapy in patients with completely resected stage II or IIIA non-small-cell lung cancer. Eastern Cooperative Oncology Group. *N Engl J Med*. 26 de octubre de 2000;343(17):1217-22.
43. Burdett S, Pignon JP, Tierney J, Tribodet H, Stewart L, Le Pechoux C, et al. Adjuvant chemotherapy for resected early-stage non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2 de marzo de 2015;2015(3):CD011430.
44. Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, Douillard JY, Shepherd FA, Stephens RJ, et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de julio de 2008;26(21):3552-9.

45. NSCLC Meta-analysis Collaborative Group. Preoperative chemotherapy for non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Lancet Lond Engl*. 3 de mayo de 2014;383(9928):1561-71.
46. Strauss GM, Herndon JE, Maddaus MA, Johnstone DW, Johnson EA, Harpole DH, et al. Adjuvant paclitaxel plus carboplatin compared with observation in stage IB non-small-cell lung cancer: CALGB 9633 with the Cancer and Leukemia Group B, Radiation Therapy Oncology Group, and North Central Cancer Treatment Group Study Groups. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de noviembre de 2008;26(31):5043-51.
47. Wu YL, Tsuboi M, He J, John T, Grohe C, Majem M, et al. Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 29 de octubre de 2020;383(18):1711-23.
48. Tsuboi M, Herbst RS, John T, Kato T, Majem M, Grohé C, et al. Overall Survival with Osimertinib in Resected EGFR-Mutated NSCLC. *N Engl J Med*. 13 de julio de 2023;389(2):137-47.
49. Wu YL, Dziadziuszko R, Ahn JS, Barlesi F, Nishio M, Lee DH, et al. Alectinib in Resected ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 11 de abril de 2024;390(14):1265-76.
50. Aupérin A, Le Péchoux C, Rolland E, Curran WJ, Furuse K, Fournel P, et al. Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de mayo de 2010;28(13):2181-90.
51. Vokes EE, Herndon JE, Crawford J, Leopold KA, Perry MC, Miller AA, et al. Randomized phase II study of cisplatin with gemcitabine or paclitaxel or vinorelbine as induction chemotherapy followed by concomitant chemoradiotherapy for stage IIIB non-small-cell lung cancer: cancer and leukemia group B study 9431. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 15 de octubre de 2002;20(20):4191-8.
52. Santana-Davila R, Devisetty K, Szabo A, Sparapani R, Arce-Lara C, Gore EM, et al. Cisplatin and etoposide versus carboplatin and paclitaxel with concurrent radiotherapy for stage III non-small-cell lung cancer: an analysis of Veterans Health Administration data. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de febrero de 2015;33(6):567-74.
53. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 3 de septiembre de 2009;361(10):947-57.
54. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a

multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* marzo de 2012;13(3):239-46.

55. Lee CK, Davies L, Wu YL, Mitsudomi T, Inoue A, Rosell R, et al. Gefitinib or Erlotinib vs Chemotherapy for EGFR Mutation-Positive Lung Cancer: Individual Patient Data Meta-Analysis of Overall Survival. *J Natl Cancer Inst.* 1 de junio de 2017;109(6).
56. Yang JCH, Wu YL, Schuler M, Sebastian M, Popat S, Yamamoto N, et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *Lancet Oncol.* febrero de 2015;16(2):141-51.
57. Sequist LV, Yang JCH, Yamamoto N, O'Byrne K, Hirsh V, Mok T, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 de septiembre de 2013;31(27):3327-34.
58. Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, Chewaskulyong B, Lee KH, et al. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 11 de enero de 2018;378(2):113-25.
59. Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D, Cho BC, Gray JE, Ohe Y, et al. Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC. *N Engl J Med.* 2 de enero de 2020;382(1):41-50.
60. Reungwetwattana T, Nakagawa K, Cho BC, Cobo M, Cho EK, Bertolini A, et al. CNS Response to Osimertinib Versus Standard Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients With Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 28 de agosto de 2018;JCO2018783118.
61. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 28 de octubre de 2010;363(18):1693-703.
62. Soria JC, Tan DSW, Chiari R, Wu YL, Paz-Ares L, Wolf J, et al. First-line ceritinib versus platinum-based chemotherapy in advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-4): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet Lond Engl.* 4 de marzo de 2017;389(10072):917-29.
63. Solomon BJ, Mok T, Kim DW, Wu YL, Nakagawa K, Mekhail T, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med.* 4 de diciembre de 2014;371(23):2167-77.
64. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, Gadgeel S, Ahn JS, Kim DW, et al. Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 31 de agosto de 2017;377(9):829-38.

65. Camidge DR, Kim HR, Ahn MJ, Yang JCH, Han JY, Hochmair MJ, et al. Brigatinib Versus Crizotinib in ALK Inhibitor-Naïve Advanced ALK-Positive NSCLC: Final Results of Phase 3 ALTA-1L Trial. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. diciembre de 2021;16(12):2091-108.
66. Horn L, Wang Z, Wu G, Poddubskaya E, Mok T, Reck M, et al. Ensartinib vs Crizotinib for Patients With Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Non-Small Cell Lung Cancer: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 1 de noviembre de 2021;7(11):1617-25.
67. Shaw AT, Bauer TM, de Marinis F, Felip E, Goto Y, Liu G, et al. First-Line Lorlatinib or Crizotinib in Advanced ALK-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med*. 19 de noviembre de 2020;383(21):2018-29.
68. Shaw AT, Riely GJ, Bang YJ, Kim DW, Camidge DR, Solomon BJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): updated results, including overall survival, from PROFILE 1001. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1 de julio de 2019;30(7):1121-6.
69. Dziadziuszko R, Krebs MG, De Braud F, Siena S, Drilon A, Doebele RC, et al. Updated Integrated Analysis of the Efficacy and Safety of Entrectinib in Locally Advanced or Metastatic ROS1 Fusion-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 de abril de 2021;39(11):1253-63.
70. Yun MR, Kim DH, Kim SY, Joo HS, Lee YW, Choi HM, et al. Repotrectinib Exhibits Potent Antitumor Activity in Treatment-Naïve and Solvent-Front-Mutant ROS1-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 de julio de 2020;26(13):3287-95.
71. Planchard D, Besse B, Groen HJM, Hashemi SMS, Mazieres J, Kim TM, et al. Phase 2 Study of Dabrafenib Plus Trametinib in Patients With BRAF V600E-Mutant Metastatic NSCLC: Updated 5-Year Survival Rates and Genomic Analysis. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. enero de 2022;17(1):103-15.
72. Drilon A, Oxnard GR, Tan DSW, Loong HHF, Johnson M, Gainor J, et al. Efficacy of Selpercatinib in RET Fusion-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 27 de agosto de 2020;383(9):813-24.
73. Griesinger F, Curigliano G, Thomas M, Subbiah V, Baik CS, Tan DSW, et al. Safety and efficacy of pralsetinib in RET fusion-positive non-small-cell lung cancer including as first-line therapy: update from the ARROW trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. noviembre de 2022;33(11):1168-78.
74. Subbiah V, Gainor JF, Oxnard GR, Tan DSW, Owen DH, Cho BC, et al. Intracranial Efficacy of Selpercatinib in RET Fusion-Positive Non-Small Cell Lung Cancers on the LIBRETTO-001 Trial. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 de agosto de 2021;27(15):4160-7.

75. Wolf J, Seto T, Han JY, Reguart N, Garon EB, Groen HJM, et al. Capmatinib in MET Exon 14-Mutated or MET-Amplified Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 3 de septiembre de 2020;383(10):944-57.
76. Le X, Sakai H, Felip E, Veillon R, Garassino MC, Raskin J, et al. Tepotinib Efficacy and Safety in Patients with MET Exon 14 Skipping NSCLC: Outcomes in Patient Subgroups from the VISION Study with Relevance for Clinical Practice. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 de marzo de 2022;28(6):1117-26.
77. Li BT, Shen R, Buonocore D, Olah ZT, Ni A, Ginsberg MS, et al. Ado-Trastuzumab Emtansine for Patients With HER2-Mutant Lung Cancers: Results From a Phase II Basket Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de agosto de 2018;36(24):2532-7.
78. Li BT, Smit EF, Goto Y, Nakagawa K, Udagawa H, Mazières J, et al. Trastuzumab Deruxtecan in HER2-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 20 de enero de 2022;386(3):241-51.
79. Demetri GD, De Braud F, Drilon A, Siena S, Patel MR, Cho BC, et al. Updated Integrated Analysis of the Efficacy and Safety of Entrectinib in Patients With NTRK Fusion-Positive Solid Tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 de abril de 2022;28(7):1302-12.
80. Drilon A, Tan DSW, Lassen UN, Leyvraz S, Liu Y, Patel JD, et al. Efficacy and Safety of Larotrectinib in Patients With Tropomyosin Receptor Kinase Fusion-Positive Lung Cancers. *JCO Precis Oncol*. enero de 2022;6:e2100418.
81. de Langen AJ, Johnson ML, Mazieres J, Dingemans AMC, Mountzios G, Pless M, et al. Sotorasib versus docetaxel for previously treated non-small-cell lung cancer with KRASG12C mutation: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 4 de marzo de 2023;401(10378):733-46.
82. Jänne PA, Riely GJ, Gadgeel SM, Heist RS, Ou SHI, Pacheco JM, et al. Adagrasib in Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring a KRASG12C Mutation. *N Engl J Med*. 14 de julio de 2022;387(2):120-31.
83. Park K, Haura EB, Leighl NB, Mitchell P, Shu CA, Girard N, et al. Amivantamab in EGFR Exon 20 Insertion-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer Progressing on Platinum Chemotherapy: Initial Results From the CHRYSALIS Phase I Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de octubre de 2021;39(30):3391-402.
84. Nicholson LB. The immune system. *Essays Biochem*. 31 de octubre de 2016;60(3):275-301.
85. Varadé J, Magadán S, González-Fernández Á. Human immunology and immunotherapy: main achievements and challenges. *Cell Mol Immunol*. abril de 2021;18(4):805-28.

86. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 25 de julio de 2013;39(1):1-10.
87. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 22 de marzo de 2012;12(4):252-64.
88. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*. 23 de marzo de 2018;359(6382):1350-5.
89. Jia L, Zhang Q, Zhang R. PD-1/PD-L1 pathway blockade works as an effective and practical therapy for cancer immunotherapy. *Cancer Biol Med*. mayo de 2018;15(2):116-23.
90. Ribas A. Tumor immunotherapy directed at PD-1. *N Engl J Med*. 28 de junio de 2012;366(26):2517-9.
91. Felip E, Altorki N, Zhou C, Csősz T, Vynnychenko I, Goloborodko O, et al. Adjuvant atezolizumab after adjuvant chemotherapy in resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 9 de octubre de 2021;398(10308):1344-57.
92. O'Brien M, Paz-Ares L, Marreaud S, Dafni U, Oselin K, Havel L, et al. Pembrolizumab versus placebo as adjuvant therapy for completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (PEARLS/KEYNOTE-091): an interim analysis of a randomised, triple-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. octubre de 2022;23(10):1274-86.
93. Forde PM, Spicer J, Lu S, Provencio M, Mitsudomi T, Awad MM, et al. Neoadjuvant Nivolumab plus Chemotherapy in Resectable Lung Cancer. *N Engl J Med*. 26 de mayo de 2022;386(21):1973-85.
94. Spicer J, Girard N, Provencio M, Wang C, Mitsudomi T, Awad MM, et al. Neoadjuvant nivolumab (NIVO) + chemotherapy (chemo) vs chemo in patients (pts) with resectable NSCLC: 4-year update from CheckMate 816. *J Clin Oncol*. 10 de junio de 2024;42(17_suppl):LBA8010-LBA8010.
95. Wakelee H, Liberman M, Kato T, Tsuboi M, Lee SH, Gao S, et al. Perioperative Pembrolizumab for Early-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 10 de agosto de 2023;389(6):491-503.
96. Spicer JD, Garassino MC, Wakelee H, Liberman M, Kato T, Tsuboi M, et al. Neoadjuvant pembrolizumab plus chemotherapy followed by adjuvant pembrolizumab compared with neoadjuvant chemotherapy alone in patients with early-stage non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-671): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 28 de septiembre de 2024;404(10459):1240-52.

97. Heymach JV, Harpole D, Mitsudomi T, Taube JM, Galffy G, Hochmair M, et al. Perioperative Durvalumab for Resectable Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2 de noviembre de 2023;389(18):1672-84.
98. Cascone T, Awad MM, Spicer JD, He J, Lu S, Sepesi B, et al. Perioperative Nivolumab in Resectable Lung Cancer. *N Engl J Med*. 16 de mayo de 2024;390(19):1756-69.
99. Spigel DR, Faivre-Finn C, Gray JE, Vicente D, Planchard D, Paz-Ares L, et al. Five-Year Survival Outcomes From the PACIFIC Trial: Durvalumab After Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de abril de 2022;40(12):1301-11.
100. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 16 de noviembre de 2017;377(20):1919-29.
101. Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, De Angelis F, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 31 de mayo de 2018;378(22):2078-92.
102. Rodríguez-Abreu D, Powell SF, Hochmair MJ, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, et al. Pemetrexed plus platinum with or without pembrolizumab in patients with previously untreated metastatic nonsquamous NSCLC: protocol-specified final analysis from KEYNOTE-189. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. julio de 2021;32(7):881-95.
103. Paz-Ares L, Luft A, Vicente D, Tafreshi A, Gümüş M, Mazières J, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 22 de noviembre de 2018;379(21):2040-51.
104. Paz-Ares L, Vicente D, Tafreshi A, Robinson A, Soto Parra H, Mazières J, et al. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Pembrolizumab Plus Chemotherapy in Patients With Metastatic Squamous NSCLC: Protocol-Specified Final Analysis of KEYNOTE-407. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. octubre de 2020;15(10):1657-69.
105. Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC - PubMed [Internet]. [citado 2 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29863955/>
106. Socinski MA, Nishio M, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, Stroyakovskiy D, et al. IMpower150 Final Overall Survival Analyses for Atezolizumab Plus Bevacizumab and Chemotherapy in First-Line Metastatic Nonsquamous NSCLC. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. noviembre de 2021;16(11):1909-24.
107. Reck M, Ciuleanu TE, Cobo M, Schenker M, Zurawski B, Menezes J, et al. First-line nivolumab plus ipilimumab with two cycles of chemotherapy versus

chemotherapy alone (four cycles) in advanced non-small-cell lung cancer: CheckMate 9LA 2-year update. ESMO Open. octubre de 2021;6(5):100273.

108. West H, McCleod M, Hussein M, Morabito A, Rittmeyer A, Conter HJ, et al. Atezolizumab in combination with carboplatin plus nab-paclitaxel chemotherapy compared with chemotherapy alone as first-line treatment for metastatic non-squamous non-small-cell lung cancer (IMpower130): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. julio de 2019;20(7):924-37.
109. Makharadze T, Gogishvili M, Melkadze T, Baramidze A, Giorgadze D, Penkov K, et al. Cemiplimab Plus Chemotherapy Versus Chemotherapy Alone in Advanced NSCLC: 2-Year Follow-Up From the Phase 3 EMPOWER-Lung 3 Part 2 Trial. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. junio de 2023;18(6):755-68.
110. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csősz T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 10 de noviembre de 2016;375(19):1823-33.
111. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csősz T, Fülöp A, et al. Five-Year Outcomes With Pembrolizumab Versus Chemotherapy for Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score ≥ 50 . *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de julio de 2021;39(21):2339-49.
112. Sezer A, Kilickap S, Gümüş M, Bondarenko I, Özgüroğlu M, Gogishvili M, et al. Cemiplimab monotherapy for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer with PD-L1 of at least 50%: a multicentre, open-label, global, phase 3, randomised, controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 13 de febrero de 2021;397(10274):592-604.
113. Özgüroğlu M, Kilickap S, Sezer A, Gümüş M, Bondarenko I, Gogishvili M, et al. First-line cemiplimab monotherapy and continued cemiplimab beyond progression plus chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer with PD-L1 50% or more (EMPOWER-Lung 1): 35-month follow-up from a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. septiembre de 2023;24(9):989-1001.
114. Jassem J, de Marinis F, Giaccone G, Vergnenegre A, Barrios CH, Morise M, et al. Updated Overall Survival Analysis From IMpower110: Atezolizumab Versus Platinum-Based Chemotherapy in Treatment-Naïve Programmed Death-Ligand 1-Selected NSCLC. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. noviembre de 2021;16(11):1872-82.
115. Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han JY, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 9 de abril de 2016;387(10027):1540-50.

116. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WEE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 9 de julio de 2015;373(2):123-35.
117. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 22 de octubre de 2015;373(17):1627-39.
118. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 21 de enero de 2017;389(10066):255-65.
119. Reck M, Kaiser R, Mellemaard A, Douillard JY, Orlov S, Krzakowski M, et al. Docetaxel plus nintedanib versus docetaxel plus placebo in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (LUME-Lung 1): a phase 3, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. febrero de 2014;15(2):143-55.
120. Shepherd FA, Dancey J, Ramlau R, Mattson K, Gralla R, O'Rourke M, et al. Prospective randomized trial of docetaxel versus best supportive care in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. mayo de 2000;18(10):2095-103.
121. Hanna N, Shepherd FA, Fossella FV, Pereira JR, De Marinis F, von Pawel J, et al. Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de mayo de 2004;22(9):1589-97.
122. Mino-Kenudson M, Schalper K, Cooper W, Dacic S, Hirsch FR, Jain D, et al. Predictive Biomarkers for Immunotherapy in Lung Cancer: Perspective From the International Association for the Study of Lung Cancer Pathology Committee. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. diciembre de 2022;17(12):1335-54.
123. Hellmann MD, Paz-Ares L, Bernabe Caro R, Zurawski B, Kim SW, Carcereny Costa E, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 21 de noviembre de 2019;381(21):2020-31.
124. Carbone DP, Reck M, Paz-Ares L, Creelan B, Horn L, Steins M, et al. First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 22 de junio de 2017;376(25):2415-26.
125. Herbst RS, Giaccone G, de Marinis F, Reinmuth N, Vergnenegre A, Barrios CH, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1-Selected Patients with NSCLC. *N Engl J Med*. 1 de octubre de 2020;383(14):1328-39.
126. Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, Beasley MB, Borczuk AC, Botling J, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results

of Blueprint Phase 2 Project. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. septiembre de 2018;13(9):1302-11.

127. Yu Y, Zeng D, Ou Q, Liu S, Li A, Chen Y, et al. Association of Survival and Immune-Related Biomarkers With Immunotherapy in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-analysis and Individual Patient-Level Analysis. *JAMA Netw Open*. 3 de julio de 2019;2(7):e196879.
128. Mok TSK, Lopes G, Cho BC, Kowalski DM, Kasahara K, Wu YL, et al. Associations of tissue tumor mutational burden and mutational status with clinical outcomes in KEYNOTE-042: pembrolizumab versus chemotherapy for advanced PD-L1-positive NSCLC. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. abril de 2023;34(4):377-88.
129. Wang Z, Wu L, Li B, Cheng Y, Li X, Wang X, et al. Toripalimab Plus Chemotherapy for Patients With Treatment-Naïve Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Multicenter Randomized Phase III Trial (CHOICE-01). *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de enero de 2023;41(3):651-63.
130. Paz-Ares L, Langer CJ, Novello S, Halmos B, Cheng Y, Gadgeel SM, et al. Pembrolizumab (pembro) plus platinum-based chemotherapy (chemo) for metastatic NSCLC: Tissue TMB (tTMB) and outcomes in KEYNOTE-021, 189, and 407. *Ann Oncol*. 1 de octubre de 2019;30:v917-8.
131. Garassino M, Rodriguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, Speranza G, et al. OA04.06 Evaluation of TMB in KEYNOTE-189: Pembrolizumab Plus Chemotherapy vs Placebo Plus Chemotherapy for Nonsquamous NSCLC. *J Thorac Oncol*. 1 de octubre de 2019;14(10):S216-7.
132. Chen X, Fang L, Zhu Y, Bao Z, Wang Q, Liu R, et al. Blood tumor mutation burden can predict the clinical response to immune checkpoint inhibitors in advanced non-small cell lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother CII*. diciembre de 2021;70(12):3513-24.
133. Zhang Y, Chang L, Yang Y, Fang W, Guan Y, Wu A, et al. The correlations of tumor mutational burden among single-region tissue, multi-region tissues and blood in non-small cell lung cancer. *J Immunother Cancer*. 3 de abril de 2019;7(1):98.
134. Socinski M, Velcheti V, Mekhail T, Chae YK, Leal TA, Dowell JE, et al. Final efficacy results from B-F1RST, a prospective phase II trial evaluating blood-based tumour mutational burden (bTMB) as a predictive biomarker for atezolizumab (atezo) in 1L non-small cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol*. 1 de octubre de 2019;30:v919-20.
135. Aggarwal C, Ben-Shachar R, Gao Y, Hyun SW, Rivers Z, Epstein C, et al. Assessment of Tumor Mutational Burden and Outcomes in Patients With Diverse Advanced Cancers Treated With Immunotherapy. *JAMA Netw Open*. 1 de mayo de 2023;6(5):e2311181.

136. Nie W, Qian J, Xu MD, Gu K, Qian FF, Hu MJ, et al. A non-linear association between blood tumor mutation burden and prognosis in NSCLC patients receiving atezolizumab. *Oncoimmunology*. 2020;9(1):1731072.
137. Kim ES, Velcheti V, Mekhail T, Yun C, Shagan SM, Hu S, et al. Blood-based tumor mutational burden as a biomarker for atezolizumab in non-small cell lung cancer: the phase 2 B-F1RST trial. *Nat Med*. mayo de 2022;28(5):939-45.
138. Huang Y, Chau YF, Bai H, Wu X, Duan J. Biomarkers for Immunotherapy in Driver-Gene-Negative Advanced NSCLC. *Int J Mol Sci*. 25 de septiembre de 2023;24(19):14521.
139. Liberini V, Mariniello A, Righi L, Capozza M, Delcuratolo MD, Terreno E, et al. NSCLC Biomarkers to Predict Response to Immunotherapy with Checkpoint Inhibitors (ICI): From the Cells to In Vivo Images. *Cancers*. 10 de septiembre de 2021;13(18):4543.
140. Mazieres J, Drilon A, Lusque A, Mhanna L, Cortot AB, Mezquita L, et al. Immune checkpoint inhibitors for patients with advanced lung cancer and oncogenic driver alterations: results from the IMMUNOTARGET registry. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1 de agosto de 2019;30(8):1321-8.
141. Rizvi N, Cho BC, Reinmuth N, Lee KH, Luft A, Ahn M, et al. OA04.07 Mutations Associated with Sensitivity or Resistance to Immunotherapy in mNSCLC: Analysis from the MYSTIC Trial. *J Thorac Oncol*. 1 de octubre de 2019;14:S217.
142. Okamura R, Kato S, Lee S, Jimenez RE, Sicklick JK, Kurzrock R. ARID1A alterations function as a biomarker for longer progression-free survival after anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy. *J Immunother Cancer*. febrero de 2020;8(1):e000438.
143. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, Gay L, Ali SM, Ennis R, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med*. 19 de abril de 2017;9(1):34.
144. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*. 28 de julio de 2017;357(6349):409-13.
145. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz HJ, Morse MA, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol*. septiembre de 2017;18(9):1182-91.
146. Lee JS, Ruppin E. Multiomics Prediction of Response Rates to Therapies to Inhibit Programmed Cell Death 1 and Programmed Cell Death 1 Ligand 1. *JAMA Oncol*. 1 de noviembre de 2019;5(11):1614-8.

147. Templeton AJ, McNamara MG, Šeruga B, Vera-Badillo FE, Aneja P, Ocaña A, et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* junio de 2014;106(6):dju124.
148. Bagley SJ, Kothari S, Aggarwal C, Bauml JM, Alley EW, Evans TL, et al. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio as a marker of outcomes in nivolumab-treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth.* abril de 2017;106:1-7.
149. Ferrucci PF, Ascierto PA, Pigozzo J, Del Vecchio M, Maio M, Antonini Cappellini GC, et al. Baseline neutrophils and derived neutrophil-to-lymphocyte ratio: prognostic relevance in metastatic melanoma patients receiving ipilimumab. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 1 de febrero de 2018;29(2):524.
150. Mezquita L, Arbour K, Auclin E, Saravia D, Rizvi H, Hendriks L, et al. 1407P Derived neutrophil-to lymphocyte ratio (dNLR) change between baseline and cycle 2 is correlated with benefit during immune checkpoint inhibitors (ICI) in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. Vol. 29, *Annals of Oncology.* 2018.
151. Mezquita L, Auclin E, Ferrara R, Charrier M, Remon J, Planchard D, et al. Association of the Lung Immune Prognostic Index With Immune Checkpoint Inhibitor Outcomes in Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol.* 1 de marzo de 2018;4(3):351-7.
152. Sorich MJ, Rowland A, Karapetis CS, Hopkins AM. Evaluation of the Lung Immune Prognostic Index for Prediction of Survival and Response in Patients Treated With Atezolizumab for NSCLC: Pooled Analysis of Clinical Trials. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* agosto de 2019;14(8):1440-6.
153. Kazandjian D, Gong Y, Keegan P, Pazdur R, Blumenthal GM. Prognostic Value of the Lung Immune Prognostic Index for Patients Treated for Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol.* 1 de octubre de 2019;5(10):1481-5.
154. Zheng H, Liu X, Zhang J, Rice SJ, Wagman M, Kong Y, 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.* 30 de agosto de 2016;7(35):56233-40.
155. Arrieta O, Montes-Servín E, Hernandez-Martinez JM, Cardona AF, Casas-Ruiz E, Crispín JC, et al. Expression of PD-1/PD-L1 and PD-L2 in peripheral T-cells from non-small cell lung cancer patients. *Oncotarget.* 24 de noviembre de 2017;8(60):101994-2005.
156. Cho MS, Lee H, Gonzalez-Delgado R, Li D, Sasano T, Carlos-Alcalde W, et al. Platelets Increase the Expression of PD-L1 in Ovarian Cancer. *Cancers.* 19 de mayo de 2022;14(10):2498.
157. Riemann D, Schütte W, Turzer S, Seliger B, Möller M. High PD-L1/CD274 Expression of Monocytes and Blood Dendritic Cells Is a Risk Factor in Lung Cancer

Patients Undergoing Treatment with PD1 Inhibitor Therapy. *Cancers*. 13 de octubre de 2020;12(10):2966.

158. Parikh K, Kumar A, Ahmed J, Anwar A, Puccio C, Chun H, et al. Peripheral monocytes and neutrophils predict response to immune checkpoint inhibitors in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* CII. septiembre de 2018;67(9):1365-70.
159. Zhang XW, Bi XW, Liu PP, Liu ZL, Nie M, Yang H, et al. Expression of PD-L1 on Monocytes Is a Novel Predictor of Prognosis in Natural Killer/T-Cell Lymphoma. *Front Oncol*. 2020;10:1360.
160. Vanhaver C, Aboubakar Nana F, Delhez N, Luyckx M, Hirsch T, Bayard A, et al. Immunosuppressive low-density neutrophils in the blood of cancer patients display a mature phenotype. *Life Sci Alliance*. enero de 2024;7(1):e202302332.
161. Kamphorst AO, Pillai RN, Yang S, Nasti TH, Akondy RS, Wieland A, et al. Proliferation of PD-1+ CD8 T cells in peripheral blood after PD-1-targeted therapy in lung cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9 de mayo de 2017;114(19):4993-8.
162. Kim KH, Cho J, Ku BM, Koh J, Sun JM, Lee SH, et al. The First-week Proliferative Response of Peripheral Blood PD-1+CD8+ T Cells Predicts the Response to Anti-PD-1 Therapy in Solid Tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 de abril de 2019;25(7):2144-54.
163. Mazzaschi G, Facchinetti F, Missale G, Canetti D, Madeddu D, Zecca A, et al. The circulating pool of functionally competent NK and CD8+ cells predicts the outcome of anti-PD1 treatment in advanced NSCLC. *Lung Cancer Amst Neth*. enero de 2019;127:153-63.
164. Duchemann B, Remon J, Naigeon M, Mezquita L, Ferrara R, Cassard L, et al. Integrating Circulating Biomarkers in the Immune Checkpoint Inhibitor Treatment in Lung Cancer. *Cancers*. 3 de diciembre de 2020;12(12):3625.
165. Wei W, Xu B, Wang Y, Wu C, Jiang J, Wu C. Prognostic significance of circulating soluble programmed death ligand-1 in patients with solid tumors: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. enero de 2018;97(3):e9617.
166. Okuma Y, Hosomi Y, Nakahara Y, Watanabe K, Sagawa Y, Homma S. High plasma levels of soluble programmed cell death ligand 1 are prognostic for reduced survival in advanced lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth*. febrero de 2017;104:1-6.
167. Zhang J, Gao J, Li Y, Nie J, Dai L, Hu W, et al. Circulating PD-L1 in NSCLC patients and the correlation between the level of PD-L1 expression and the clinical characteristics. *Thorac Cancer*. julio de 2015;6(4):534-8.

168. Okuma Y, Wakui H, Utsumi H, Sagawa Y, Hosomi Y, Kuwano K, et al. Soluble Programmed Cell Death Ligand 1 as a Novel Biomarker for Nivolumab Therapy for Non-Small-cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*. septiembre de 2018;19(5):410-417.e1.
169. Costantini A, Julie C, Dumenil C, Hélias-Rodzewicz Z, Tisserand J, Dumoulin J, et al. Predictive role of plasmatic biomarkers in advanced non-small cell lung cancer treated by nivolumab. *Oncoimmunology*. 2018;7(8):e1452581.
170. Hardy-Werbin M, Rocha P, Arpi O, Taus Á, Nonell L, Durán X, et al. Serum cytokine levels as predictive biomarkers of benefit from ipilimumab in small cell lung cancer. *Oncoimmunology*. 2019;8(6):e1593810.
171. Liu C, Yang L, Xu H, Zheng S, Wang Z, Wang S, et al. Systematic analysis of IL-6 as a predictive biomarker and desensitizer of immunotherapy responses in patients with non-small cell lung cancer. *BMC Med*. 13 de mayo de 2022;20(1):187.
172. Sanmamed MF, Perez-Gracia JL, Schalper KA, Fusco JP, Gonzalez A, Rodriguez-Ruiz ME, et al. Changes in serum interleukin-8 (IL-8) levels reflect and predict response to anti-PD-1 treatment in melanoma and non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1 de agosto de 2017;28(8):1988-95.
173. Boutsikou E, Domvri K, Hardavella G, Tsiouda D, Zarogoulidis K, Kontakiotis T. Tumour necrosis factor, interferon-gamma and interleukins as predictive markers of antiprogrammed cell-death protein-1 treatment in advanced non-small cell lung cancer: a pragmatic approach in clinical practice. *Ther Adv Med Oncol*. 2018;10:1758835918768238.

