



TESIS DOCTORAL

Estudio de poblaciones celulares en
pacientes con linfoma difuso de
células B grandes refractarios o en
recaída: papel de las células supresoras
de origen mieloide como marcador de
respuesta al tratamiento R2-GDP

CARLOS JIMÉNEZ CORTEGANA

SEVILLA, 2020





TESIS DOCTORAL

Estudio poblaciones celulares en pacientes con linfoma difuso de células B grandes refractarios o en recaída:
Papel de las células supresoras de origen mieloide en respuesta al tratamiento R2-GDP

CARLOS JIMÉNEZ CORTEGANA

Directores:

Dr. VÍCTOR SÁNCHEZ MARGALET

Dr. LUIS DE LA CRUZ MERINO

Programa de Doctorado: Biología Molecular, Biomedicina
e Investigación Clínica

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR E INMUNOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA (UNIVERSIDAD DE SEVILLA)



SEVILLA, 2020



Estudio poblaciones celulares en pacientes con linfoma
difuso de células B grandes refractarios o en recaída:
Papel de las células supresoras de origen mieloide en
respuesta al tratamiento R2-GDP

Trabajo realizado para optar al grado de Doctor por
Carlos Jiménez Cortegana

VºBº por los Directores de Tesis

Dr. Víctor Sánchez Margalet

Dr. Luis de la Cruz Merino

El doctorando

Carlos Jiménez Cortegana

"Coming together is the beginning.

Keeping together is progress.

Working together is success."

- Henry Ford

A mi familia, que siempre cree que puedo.

Aunque si no fuera por ellos, no podría.

Resumen

La inmunoedición, que se caracteriza por el escape que realizan las células malignas de la inmunovigilancia antitumoral, fue reconocida hace unos años como un nuevo *hallmark* del cáncer. En diversos tipos de neoplasias, como el cáncer de mama o algunos linfomas, se ha comprobado cómo la infiltración linfocitaria tumoral y ciertos marcadores del perfil inmune en sangre periférica pueden suponer factores pronósticos y/o predictivos de respuesta a determinados tratamientos oncológicos.

En esta Tesis Doctoral, enmarcada en el estudio titulado “Ensayo fase II para valorar la combinación de lenalidomida con R-GDP (R2-GDP) en pacientes con linfoma difuso de células grandes B refractarios o en recaída (R/R DLBCL) no candidatos a quimioterapia a altas dosis y trasplante de células progenitoras hematopoyéticas”, se ha analizado por citometría de flujo el perfil inmune de los pacientes que padecen dicha enfermedad antes, durante y tras el tratamiento R2-GDP, basado en lenalidomida, rituximab, gemcitabina, dexametasona y cisplatino. Asimismo, los resultados obtenidos se han comparado con una cohorte de sujetos sanos que ha sido empleada como control y se han correlacionado con otros parámetros, como los subtipos de DLBCL, los niveles de vitamina D antes de iniciar el tratamiento o la tasa de respuesta objetiva.

Entre todos los parámetros del perfil inmune analizados cabe destacar las células supresoras de origen mieloide (MDSC), que comprenden un subconjunto heterogéneo de células inmaduras que, entre otras funciones, son capaces de inhibir la respuesta inmune antitumoral que ejercen los linfocitos T y promover la angiogénesis. En los últimos años, diversos estudios han demostrado altos niveles de

estas células en el microambiente tumoral, por ello se ha analizado también la correlación existente en sangre periférica entre estas (y otras poblaciones celulares) con la respuesta a la terapia empleada.

Los resultados obtenidos arrojan datos prometedores de respuesta a este tratamiento para los pacientes con DLBCL que son refractarios o sufren recaídas de la terapia de primera línea. En general, con la inmunoterapia R2-GDP se ha establecido un *score* inmunológico en el que determinados conjuntos celulares podrían ser un posible marcador pronóstico y/o predictivo de respuesta. En particular, este tratamiento ha hecho disminuir de forma significativa el nivel de MDSC, al menos en los pacientes que han obtenido una buena respuesta, lo cual podría permitir establecer a este conjunto celular como una importante diana terapéutica contra la progresión tumoral, así como ser un potencial marcador de respuesta al tratamiento.

Agradecimientos

Esta etapa que ya termina ha sido una experiencia muy distinta a lo que imaginé cuando entré en la Universidad; un reto por haber explorado un camino nuevo, desconocido y diferente para mí. Aparte de los buenos momentos, también me quedo con todo lo que he aprendido durante estos años. Creo que el mayor aprendizaje que me llevo es conocer el verdadero significado de la investigación, ya que detrás de obtener resultados en el laboratorio hay muchas horas y mucho esfuerzo a las espaldas. En todo ese tiempo dedicado considero que es vital mantener una buena actitud, tener interés y rigor, desarrollar el pensamiento crítico, estar motivado y ser constante y persistente. Y, aun así, en algunas ocasiones los resultados no terminan siendo los esperados. Creo haber entendido a muchas de las personas que he conocido durante estos años, que por propia experiencia piensan que *la investigación es muy dura y muy sacrificada, pero también muy necesaria*. Por ello, el camino hasta aquí no ha sido fácil y para seguir creciendo he estado rodeado de personas cuya colaboración e implicación han permitido que el trabajo de estos últimos años esté aquí plasmado.

En primer lugar, agradezco a mis directores de tesis, **Víctor Sánchez** y **Luis de la Cruz**, la confianza que tuvisteis en mí desde el primer día y la oportunidad que me disteis de desarrollar este proyecto. Desde el principio sembrasteis en mí el interés por la inmuno-oncología y en estos poco más de 5 años juntos me habéis permitido trabajar en un equipo multidisciplinar y formarme en la investigación clínica.

Quiero dar las gracias también al grupo **GOTEL**, promotor del ensayo clínico, y a los **hospitales** colaboradores en el estudio. Es importante mencionar la participación de todas las personas en este estudio,

especialmente los **pacientes** y sus **familias**, que decidieron prestar su ayuda a pesar del duro momento que estaban atravesando. Sin ellos, está claro que el proyecto no podría haber salido adelante.

Del Hospital Virgen Macarena agradezco la colaboración de todas y cada una de las **técnicos** y **residentes** que han pasado por el Laboratorio de Citometría de Flujo, especialmente **Lola Muelas** y **Pepa Acevedo**, porque cuando llegué el primer día no sabía nada y vosotras me lo enseñasteis todo. A **Eva Recio** e **Irene Borreguero**, encargadas del ensayo clínico en el hospital, por la predisposición y la ayuda cuando os he necesitado. A **Paqui Solano**, por tu simpatía y amabilidad. A **Toñi Buendía** y **Antonio Barco**, por vuestra ayuda con la determinación de la vitamina D. A las personas del área de Oncología Médica: gracias a **María Luisa Sánchez**, **Mónica Suengas**, **Natalia Palazón**, **Isabel Araújo** y **Esteban Nogales**, la colaboración de **Adoración Nieto**... Porque en cada charla y en cada reunión que hemos tenido y en cada duda que me habéis resuelto he aprendido muchísimo, lo cual he intentado plasmar en este trabajo.

Del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología os doy las gracias a todas las personas que habéis pasado y a las que aún seguís, porque de alguna u otra forma habéis aportado vuestro granito de arena: **Alicia Pérez**, **Ana López**, **Inma Suárez**, **Esther Lobato**, **Miriam Pinto**, **Mari Carmen Jiménez**, **Cristina Porras**, **Sergio Montserrat**, **María José Barbero**, **Carmen Gómez**, **Mari Carmen Naranjo**, **María Ramos**, **Dora Puente**... Gracias a **Verónica Carranco**, por tu interminable sonrisa, y a **Natalia Evtikhova**, **Antonio Carmona**, **Antonio Pérez** y **Teresa Vilariño**, por todo lo que me habéis aportado y enseñado y por haberme hecho sentir como en casa desde el primer día. A **Sole López** y **Gonzalo Alba**, por los muchísimos consejos y la predisposición en todo momento; es un placer

compartir tiempo y trabajo con vosotros. A **Miguel Lucas** y **Paco Sobrino**, por vuestra amabilidad cuando os pedí colaborar en este estudio. A **Iván Cruz**, por esas charlas que me han ayudado a mejorar.

Gracias a mis amigos **Sergio García**, **Carlos Fernández**, **José Manuel Camero**, **Raquel Pozo**, **Juan Carlos Camero**, **Alejandro López** y **Juan Luis López**, porque sois personas fantásticas y es genial compartir y disfrutar momentos juntos. A **Carlos Dueñas**, el eterno toledano, porque eres una persona espectacular y *misteriosa*. Y a **Mamy Celestin**, por el ánimo que me transmites a pesar de la distancia y por tus palabras siempre llenas de cariño y positividad.

A ti, **Flora**. Gracias por tu apoyo, tu cariño, tu paciencia y tus consejos. Pese a que el camino a veces no es fácil, cueste lo que cueste, eres y serás capaz de conseguir todo lo que te propongas. Ve a por ello, te mereces lo mejor de esta vida.

Sé que dejo a muchas personas sin nombrar en las líneas anteriores, pero no por ello considero que vuestra aportación haya sido menos importante. Me llevo el apoyo y el afecto que he recibido durante estos años. A todos vosotros, mil gracias.

Por último, gracias infinitas a mi familia. A mis padres, **Leo Jiménez** y **Antonia Cortegana**, y a mi hermana, **Antonia Jiménez**, porque habéis vivido y soportado en primera persona todo el esfuerzo, el empeño y el trabajo que hay detrás de la realización de esta tesis. Vuestros consejos y vuestros ánimos han sido muy importantes para superar los obstáculos que me he ido encontrando en el camino durante 27 años. Vuestros consejos y vuestros ánimos serán muy importantes, también, en el futuro.

Abreviaturas

ABC	Fenotipo de células B activadas
APC	Célula presentadora de antígeno
BCR	Receptor de linfocitos B
Breg	Linfocitos B reguladores
CD	Marcador de diferenciación celular
CTL	Linfocitos T citotóxicos
CTLA-4	Antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos
DAMP	Estructura molecular asociada a daño
DLBCL	Linfoma difuso de células B grandes
GCB	Fenotipo de centro germinal
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
GEP	Perfil de expresión génica
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de monocitos y granulocitos
HLA	Antígeno leucocitario humano
IFN- γ	Interferón γ
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
ILC	Células linfoides innatas
IMC	Células mieloides inmaduras
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IPI	Índice Pronóstico Internacional
M-CSF	Factor estimulador de colonias de monocitos
MDSC	Células supresoras de origen mieloide
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad

M-MDSC	Células supresoras de origen mieloide de estirpe monocítica
NK	Células Natural Killer
PAMP	Estructura molecular asociada a patógenos
PD-1	Receptor de muerte programada 1
PMN-MDSC	Células supresoras de origen mieloide de estirpe polimorfonuclear
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
R-CHOP	Rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona
R-GDP	Rituximab, gemcitabina, dexametasona y cisplatino.
ROS	Especies reactivas de oxígeno
R2-GDP	Rituximab, lenalidomida, gemcitabina, dexametasona y cisplatino.
SI	Sistema inmune
SIA	Sistema inmune adaptativo
SII	Sistema inmune innato
TAM	Macrófagos asociados al tumor
TAN	Neutrófilos asociados al tumor
TCR	Receptor de linfocitos T
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
Th	Linfocitos T colaboradores
TIL	Linfocitos infiltrantes del tumor
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
Treg	Linfocitos T reguladores
TRO	Tasa de respuesta objetiva
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

Tablas y Figuras

Tabla 1. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (2016) de subtipos de DLBCL y entidades relacionadas.

Tabla 2. Índice de Pronóstico Internacional para linfomas no Hodgkin y puntuación según el grupo de riesgo.

Tabla 3. Características de los pacientes incluidos en el estudio R2-GDP-GOTEL.

Figura 1. Diferenciación celular durante la hematopoyesis.

Figura 2. Componentes del sistema inmune.

Figura 3. Papel de los linfocitos infiltrantes del tumor en el microambiente tumoral.

Figura 4. Los *hallmarks* del cáncer propuestos originalmente para explicar el desarrollo y la proliferación tumoral.

Figura 5. Etapas de la inmunoección del cáncer.

Figura 6. Nuevos *hallmarks* del cáncer y características que facilitan su adquisición.

Figura 7. Principales interacciones co-inhedoras que tienen lugar entre las APC y los linfocitos T.

Figura 8. Mecanismos de progresión tumoral de las MDSC.

Figura 9. Tipos de linfoma no Hodgkin.

Figura 10. Esquema del algoritmo de Hans.

Figura 11. Principales funciones de la lenalidomida en el microambiente tumoral.

Figura 12. Pacientes reclutados por centro en el estudio R2-GDP-GOTEL.

Figura 13. Tasa de respuesta objetiva en el estudio R2-GDP-GOTEL.

Figura 14. Correlación, en tanto por ciento, de las respuestas al tratamiento en función del fenotipo de tumor.

Figura 15. Niveles basales de leucocitos totales y comparación con la cohorte sana.

Figura 16. Niveles de leucocitos totales en cada ciclo de tratamiento en los grupos de respuesta completa y progresión de la enfermedad.

Figura 17. Niveles de leucocitos totales en cada ciclo de tratamiento en función de los niveles de vitamina D.

Figura 18. Niveles de leucocitos totales en función del subtipo de DLBCL en cada ciclo de tratamiento.

Figura 19. Niveles basales de neutrófilos y comparación con la cohorte sana.

Figura 20. Niveles de neutrófilos en cada ciclo de tratamiento en los grupos de respuesta completa y progresión de la enfermedad.

Figura 21. Niveles de neutrófilos en cada ciclo de tratamiento en función de la concentración de vitamina D.

Figura 22. Niveles de neutrófilos en función del subtipo de DLBCL en cada ciclo de tratamiento.

Figura 23. Niveles basales de monocitos y comparación con la cohorte sana.

Figura 24. Niveles de monocitos en cada ciclo de tratamiento en los grupos de respuesta completa y progresión de la enfermedad.

Figura 25. Niveles de monocitos en cada ciclo de tratamiento en función de la concentración de vitamina D.

Figura 26. Niveles de monocitos en función del subtipo de DLBCL en cada ciclo de tratamiento.

Figura 27. Niveles basales de linfocitos totales y comparación con la cohorte sana.

Figura 28. Niveles de linfocitos totales en cada ciclo de tratamiento en los grupos de respuesta completa y progresión de la enfermedad.

Figura 29. Niveles de linfocitos totales en cada ciclo de tratamiento en función de la concentración de vitamina D.

Figura 30. Niveles de linfocitos totales en función del subtipo de DLBCL en cada ciclo de tratamiento analizado.

Figura 31. Niveles basales de linfocitos T y comparación con la cohorte sana.

Figura 32. Niveles de linfocitos T en cada ciclo de tratamiento en los grupos de respuesta completa y progresión de la enfermedad.

Figura 33. Niveles de linfocitos T en cada ciclo de tratamiento en función de la concentración de vitamina D.

Figura 34. Niveles de linfocitos T en función del subtipo de DLBCL en cada ciclo de tratamiento analizado.

Figura 35. Niveles basales de linfocitos B y comparación con la cohorte sana.

Figura 36. Niveles de linfocitos B en cada ciclo de tratamiento en los grupos de respuesta completa y progresión de la enfermedad.

Figura 37. Niveles de linfocitos B en cada ciclo de tratamiento en función de la concentración de vitamina D.

Figura 38. Niveles de linfocitos B en función del subtipo de DLBCL en cada ciclo de tratamiento analizado.

Figura 39. Niveles basales de linfocitos NK y comparación con la cohorte sana.

Figura 40. Niveles de linfocitos NK en cada ciclo de tratamiento en los grupos de respuesta completa y progresión de la enfermedad.

Figura 41. Niveles de linfocitos NK en cada ciclo de tratamiento en función de la concentración de vitamina D.

Figura 42. Niveles de linfocitos NK en función del subtipo de DLBCL en cada ciclo de tratamiento analizado.

Figura 43. Niveles basales de linfocitos T CD4 y comparación con la cohorte sana.

Figura 44. Niveles de linfocitos T CD4 en cada ciclo de tratamiento en los grupos de respuesta completa y progresión de la enfermedad.

Figura 45. Niveles de linfocitos T CD4 en cada ciclo de tratamiento en función de la concentración de vitamina D.

Figura 46. Niveles de linfocitos T CD4 en función del subtipo de DLBCL en cada ciclo de tratamiento analizado.

Figura 47. Niveles basales de linfocitos T CD8 y comparación con la cohorte sana.

Figura 48. Niveles de linfocitos T CD8 en cada ciclo de tratamiento en los grupos de respuesta completa y progresión de la enfermedad.

Figura 49. Niveles de linfocitos T CD8 en cada ciclo de tratamiento en función de la concentración de vitamina D.

Figura 50. Niveles de linfocitos T CD8 en función del subtipo de DLBCL en cada ciclo de tratamiento analizado.

Figura 51. Niveles basales de linfocitos T CD4⁺CD8⁺ y comparación con la cohorte sana.

Figura 52 Niveles de linfocitos T CD4⁺CD8⁺ en cada ciclo de tratamiento en los grupos de respuesta completa y progresión de la enfermedad.

Figura 53. Niveles de linfocitos T CD4⁺CD8⁺ en cada ciclo de tratamiento en función de la concentración de vitamina D.

Figura 54. Niveles de linfocitos T CD4⁺CD8⁺ en función del subtipo de DLBCL en cada ciclo de tratamiento analizado.

Figura 55. Niveles basales de linfocitos T reguladores y comparación con la cohorte sana.

Figura 56. Niveles de linfocitos T reguladores en cada ciclo de tratamiento en los grupos de respuesta completa y progresión de la enfermedad.

Figura 57. Niveles de linfocitos T reguladores en cada ciclo de tratamiento en función de la concentración de vitamina D.

Figura 58. Niveles de linfocitos T reguladores en función del subtipo de DLBCL en cada ciclo de tratamiento analizado.

Figura 59. Niveles basales de M-MDSC, PMN-MDSC y MDSC totales y comparación con la cohorte sana.

Figura 60. Niveles de M-MDSC, PMN-MDSC y MDSC totales a lo largo del tratamiento.

Figura 61. Niveles de M-MDSC en cada ciclo de tratamiento en los grupos de respuesta completa y progresión de la enfermedad.

Figura 62. Niveles de PMN-MDSC en cada ciclo de tratamiento en los grupos de respuesta completa y progresión de la enfermedad.

Figura 63. Niveles de M-MDSC en cada ciclo de tratamiento en función de la concentración de vitamina D.

Figura 64. Niveles de PMN-MDSC en cada ciclo de tratamiento en función de la concentración de vitamina D.

Figura 65. Niveles de M-MDSC en función del subtipo de DLBCL en cada ciclo de tratamiento analizado.

Figura 66. Niveles de PMN-MDSC en función del subtipo de DLBCL en cada ciclo de tratamiento analizado.

Figura 67. Ratio CD4/CD8 basal y comparación con la cohorte sana.

Figura 68. Ratio CD4/CD8 en cada ciclo de tratamiento en los grupos de respuesta completa y progresión de la enfermedad.

Figura 69. Ratio CD4/CD8 en cada ciclo de tratamiento en función de la concentración de vitamina D.

Figura 70. Ratio CD4/CD8 en función del subtipo de DLBCL en cada ciclo de tratamiento analizado.

Figura 71. Ratio CD8/Treg basal y comparación con la cohorte sana.

Figura 72. Ratio CD8/Treg en cada ciclo de tratamiento en los grupos de respuesta completa y progresión de la enfermedad.

Figura 73. Ratio CD8/Treg en cada ciclo de tratamiento en función de la concentración de vitamina D.

Figura 74. Ratio CD8/Treg en función del subtipo de DLBCL en cada ciclo de tratamiento analizado.

Figura 75. Ratio linfocitos/monocitos basal y comparación con la cohorte sana.

Figura 76. Ratio linfocitos/monocitos en cada ciclo de tratamiento en los grupos de respuesta completa y progresión de la enfermedad.

Figura 77. Ratio linfocitos/monocitos en cada ciclo de tratamiento en función de la concentración de vitamina D.

Figura 78. Ratio linfocitos/monocitos en función del subtipo de DLBCL en cada ciclo de tratamiento analizado.

Figura 79. Ratio neutrófilos/linfocitos basal y comparación con la cohorte sana.

Figura 80. Ratio neutrófilos/linfocitos en cada ciclo de tratamiento en los grupos de respuesta completa y progresión de la enfermedad.

Figura 81. Ratio neutrófilos/linfocitos en cada ciclo de tratamiento en función de la concentración de vitamina D.

Figura 82. Ratio neutrófilos/linfocitos en función del subtipo de DLBCL en cada ciclo de tratamiento analizado.

Figura 83. Niveles basales de vitamina D y comparación con la cohorte sana.

Figura 84. Niveles basales de vitamina D en los grupos de respuesta completa y progresión de la enfermedad.

Figura 85. Número de pacientes con respuesta completa y progresión de la enfermedad en función de la concentración de vitamina D.

Figura 86. Niveles basales de vitamina D en función del subtipo de DLBCL.

Figura 87. Número de pacientes con fenotipo GCB y no GCB en función de la concentración de vitamina D.

Índice

Resumen	9
Agradecimientos	11
Abreviaturas	15
Tablas y Figuras	17
I. Introducción	31
1. Inmunología del cáncer.....	31
1.1. Aspectos generales.....	31
1.2. El sistema inmune en el desarrollo del cáncer.....	32
1.3. El sistema inmune como sistema antitumoral.....	35
1.3.1. Sistema inmune innato.	37
1.3.2. Sistema inmune adaptativo.	45
1.3.3. El inicio de la respuesta inmune.....	50
1.3.3.1. Tipos de antígenos tumorales.	52
1.3.4. La inmunomodulación del cáncer.	53
1.3.5. Inmunoterapia.....	60
1.3.6. El inmunoescape tumoral.	62
1.3.6.1. Tipos de antígenos tumorales.	62
1.3.6.2. Células supresoras de la respuesta inmune.	66
2. Linfoma difuso de células B grandes.....	80
2.1. Definición.	80
2.2. Incidencia.	81
2.3. Clasificación.....	82
2.3.1. DLBCL no especificados en otras categorías.....	84
2.3.2. Otros subtipos de DLBCL.....	85
2.3.3. Otros linfomas de células B grandes.....	86

2.3.4.	Linfomas de células B con características intermedias entre DLBCL y otras neoplasias linfoides.	87
2.4.	Factores pronósticos.	88
2.4.1.	Índice de Pronóstico Internacional	89
2.4.2.	Perfiles de expresión génica.....	90
2.4.3.	Métodos inmunohistoquímicos	91
2.4.4.	Métodos moleculares	92
2.4.5.	MicroRNA	93
2.4.6.	Vitamina D.....	93
2.4.7.	El microambiente tumoral	94
2.5.	Tratamientos	95
2.5.1.	Tratamiento de primera línea: R-CHOP	96
2.5.2.	Tratamiento de segunda línea: R2-GDP	98
2.5.2.1.	Tratamientos alternativos de segunda línea	101
II.	Justificación.....	105
III.	Hipótesis y objetivos	109
1.	Hipótesis.....	109
2.	Objetivos	109
2.1.	Objetivos principales	110
2.1.	Objetivos secundarios	110
IV.	Metodología	113
1.	Diseño del estudio.....	113
2.	Sujetos de estudio.....	113
2.1.	Pacientes.	113
2.1.1.	Criterios de inclusión.....	113
2.1.2.	Criterios de exclusión.....	114
2.1.3.	Criterios de retirada	116

2.2. Cohorte sana.	117
3. Protocolo terapéutico.	117
3.1. Fase de inducción: esquema R2-GDP.	117
3.2. Fase de mantenimiento.	118
4. Materiales.	119
4.1. Estudio de células supresoras de origen mieloide.	119
4.2. Estudio de linfocitos T reguladores.	120
4.3. Estudio de otras subpoblaciones linfocitarias.	121
4.4. Estudio de otras poblaciones celulares.	121
4.5. Estudio de vitamina D.	121
4.6. Otros reactivos empleados.	122
5. Procedimiento.	122
5.1. Estudio de poblaciones celulares por citometría de flujo.	122
5.2. Estudio de otras subpoblaciones celulares.	123
5.3. Estudio de vitamina D.	123
6. Tratamiento de los datos.	124
6.1. Cálculo del tamaño muestral.	124
6.2. Análisis estadístico.	124
7. Limitaciones del estudio.	125
8. Tratamiento de los datos.	126
8.1. Comité ético.	126
8.2. Consentimiento informado.	126
V. Resultados.	129
VI. Discusión de resultados.	133
VII. Conclusiones.	137
VIII. Bibliografía.	141
Anexo I. Dictamen del Comité Ético.	177
Anexo II. Consentimientos informados.	179
Notas.	187

Introducción

I. Introducción

1. Inmunología del cáncer.

1.1. Aspectos generales.

El cáncer engloba a un grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo debido a la multiplicación celular anormal que puede provocar la invasión de zonas adyacentes u otros órganos, proceso conocido como metástasis. El proceso por el cual una célula normal pasa a ser tumoral se denomina tumorigénesis y pueden diferenciarse tres etapas:

1. En la primera etapa, una sola célula puede pasar a un estado tumoral debido a una interacción entre los factores genéticos del paciente, como la existencia de daños en el ADN, conocidos como daños genéticos, y/o daños en los mecanismos de regulación del ADN, o daños epigenéticos, y tres categorías de agentes externos que pueden aparecer de forma individual o colectiva: los carcinógenos físicos, como la radiación ultravioleta emitida por la luz solar o la radiación ionizante emitida por sustancias radioactivas; los carcinógenos químicos, como agentes hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas o colorantes nitrogenados; y los carcinógenos biológicos, como las infecciones causadas por algunos virus, bacterias o parásitos, como los virus de las hepatitis B y C en el cáncer de hígado o el virus del papiloma humano en el cáncer de cuello uterino.

2. El segundo paso de la tumorigénesis se produce a partir de la exposición a un agente promotor, que estimula la división de las células tumorales.
3. Por último, en la tercera etapa, se confieren las capacidades invasivas y metastatizantes debido a nuevas mutaciones o cambios epigenéticos, las células tumorales promueven señales de crecimiento y son capaces de destruir la matriz extracelular para llegar a los vasos sanguíneos. Este tercer paso es fundamental, porque de no ocurrir se tendría un tumor benigno y localizado.

En la tumorigénesis, la transformación maligna de las células sanas ocurre por la acumulación de mutaciones en unos genes específicos que reciben el nombre de proto-oncogenes y genes supresores de tumores. Los proto-oncogenes se encargan de regular la producción de determinadas proteínas como los factores de crecimiento para la proliferación y diferenciación de las células sanas. Cuando estos genes sufren mutaciones se transforman en oncogenes, que inducen la proliferación acelerada y descontrolada de las células, por lo que éstas adquieren unas determinadas características que las hacen malignas para el individuo. Por otro lado, los genes supresores de tumores regulan negativamente el crecimiento de las células sanas, controlando la función de los proto-oncogenes. Si los genes supresores de tumores no están presentes en las células o sufren mutaciones también se producirá una proliferación celular anormal.

1.2. El sistema inmune en el desarrollo del cáncer.

Además de los factores externos y la acumulación de alteraciones genéticas, el cáncer engloba un conjunto de enfermedades donde también es muy importante el papel dual que desempeña el

sistema inmune (SI), ya que existen diversos conjuntos celulares y moleculares que se encuentran involucrados tanto en la respuesta antitumoral como en la posible progresión del tumor (Zamarron y Chen, 2011). En condiciones normales, el SI de un individuo posee varias funciones: se encarga de detectar los agentes causantes del daño en un proceso conocido como reconocimiento inmune, elimina los patógenos por medio de funciones efectoras, es capaz de autorregularse tras finalizar su eliminación y tiene la capacidad de proteger al individuo frente al mismo patógeno en futuras enfermedades a través de la denominada memoria inmune.

Durante el reconocimiento inmune, una vez que el SI ha detectado los agentes causantes del daño, como por ejemplo los microbios, les impide su avance y los elimina o les limita su crecimiento a través de las barreras epiteliales que conforman la piel, los pulmones y los aparatos respiratorio y digestivo. Por el contrario, si estos microorganismos son capaces de evadir las barreras epiteliales podrían provocar un daño tisular que se vería neutralizado por una reacción local denominada inflamación, que se trata del reclutamiento de leucocitos (fagocitos, neutrófilos y monocitos) y proteínas plasmáticas desde la sangre para su posterior acumulación en los tejidos afectados y su activación para destruir a los microorganismos causantes de daño.

Desde que en el siglo XIX se presenciaron por primera vez leucocitos en un tumor se creyó en una posible relación entre la inflamación y el cáncer, pero hasta 1915 no se demostró experimentalmente el punto de unión entre ambas y hasta hace unas décadas no se entendían completamente los mecanismos a través de los cuales la inflamación ejerce efectos protumorales a través de células, citoquinas o factores de crecimiento (Fujiki, 2014).

Aunque la respuesta inflamatoria desencadenada por la infección es beneficiosa para reparar el tejido dañado, se sabe que es necesaria la presencia de un microambiente inflamatorio para favorecer el desarrollo y la progresión tumoral. Dicho en otras palabras, en condiciones patológicas la inflamación actúa en el inicio y en la promoción del desarrollo del tumor, etapas que engloban la tumorogénesis, jugando un papel clave porque puede promover mutaciones oncogénicas, inestabilidad genómica, modificaciones epigenéticas, proliferación y supervivencia de células potencialmente malignas, estimulación de la angiogénesis, inmunosupresión e incluso metástasis.

Si la inflamación no consigue ser regulada por el SI puede llegar a convertirse en crónica, induciendo la transformación maligna de las células (Landskron *et al.*, 2014). Durante la tumorogénesis, la inflamación crónica puede ser producida de varias maneras: por ejemplo, se puede desarrollar por la existencia de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad celíaca o el síndrome de Sjögren, que presentan una relación directa con el desarrollo de linfomas (Baecklund *et al.*, 2014), aunque esto no quiere decir que en todos los casos se desarrollen linfomas o cualquier otro tipo de cáncer. Por ejemplo, algunas enfermedades de inflamación como la psoriasis disminuyen ese riesgo (Grivennikov, Greten y Karin, 2010). La inflamación también podría convertirse en crónica si existen factores como la obesidad, que está demostrado ser un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas, ya que se encuentran niveles elevados de insulina y leptina que activan vías específicas que promueven el crecimiento, la supervivencia y la proliferación de células tumorales (Rose y Vona-Davis, 2012; Pérez-Pérez *et al.*, 2016). Además, algunos tratamientos como la radioterapia y la quimioterapia también contribuyen a que la inflamación se convierta en crónica, ya

que estos procesos causan la muerte necrótica de células tumorales y tejidos circundantes de forma masiva y desencadenan una reacción inflamatoria similar a la cicatrización de heridas. En este caso, la inflamación puede mejorar la presentación antigénica, permitiendo así la destrucción de células tumorales (Grivennikov, Greten y Karin, 2010).

1.3. El sistema inmune como sistema antitumoral.

Las células sanguíneas se generan por primera vez en el saco vitelino durante el desarrollo fetal en un proceso denominado hematopoyesis y cambian de lugar de producción conforme el individuo se desarrolla, hasta tener lugar en la médula ósea. Cuando esta se daña o cuando se requiere un aumento en la producción celular, el hígado y el bazo también suelen actuar como productores hematopoyéticos.

Todas las células surgen de la célula troncal hematopoyética (HSC, del inglés *hematopoietic stem cell*), la cual se caracteriza por ser pluripotente y por la presencia de los marcadores de superficie CD34 y c-Kit. Las HSC producen dos familias de células especializadas por medio de la acción de diferentes citoquinas, tal como se observa en la Figura 1: aquella familia que tiene un precursor mieloide común y que más tarde dará lugar a células como eritrocitos, plaquetas, mastocitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos, monocitos (y macrófagos) y células dendríticas; y aquella que tiene un precursor común linfoide, que dará lugar a los linfocitos T (citotóxicos, colaboradores y reguladores), B y NK.

Aparte de las funciones ya mencionadas anteriormente en la defensa contra patógenos o células tumorales, el SI también se caracteriza por su habilidad para reconocer lo propio de lo extraño. Esta capacidad de distinción en beneficio del individuo la desarrolla el SI a través de dos mecanismos de defensa claramente diferenciados por

sus características, aunque a veces actúan de manera coordinada: el sistema inmune innato (SII) y el sistema inmune adaptativo, también denominado sistema inmune adquirido (SIA).

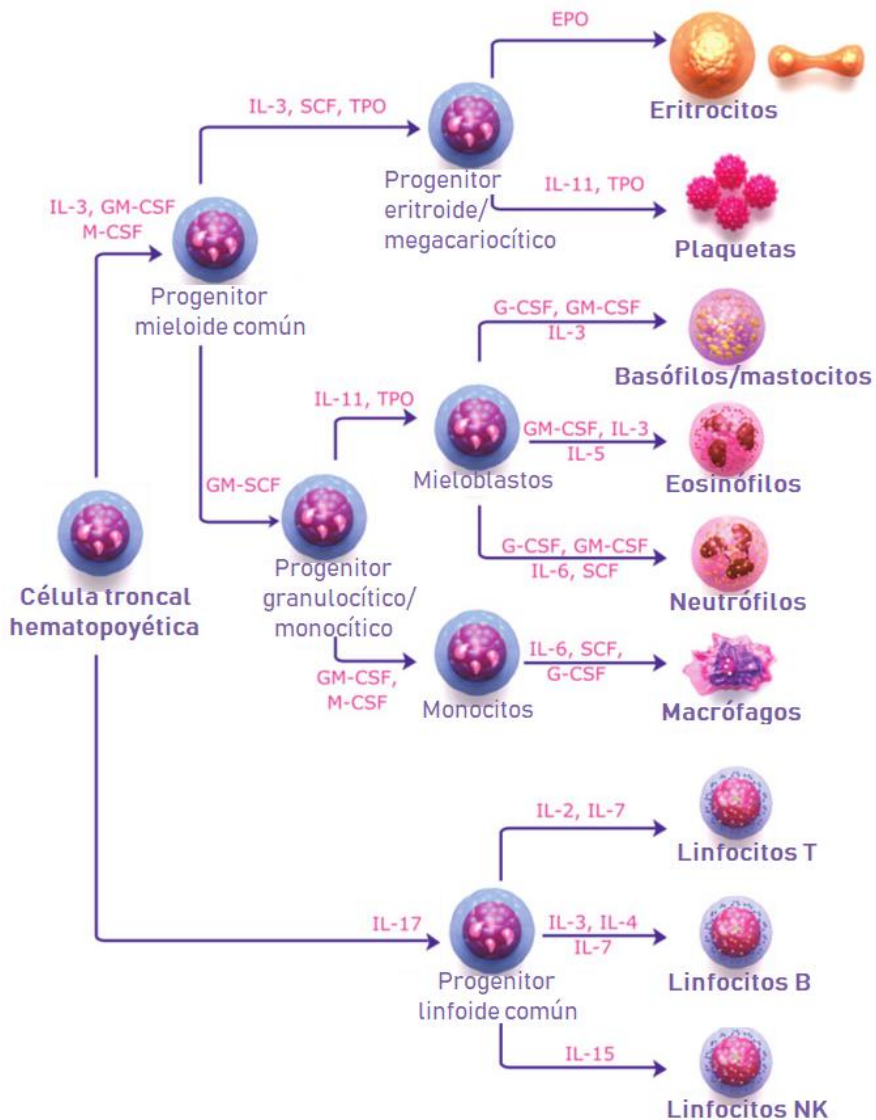


Figura 1. Diferenciación celular durante la hematopoyesis. Todas las células surgen de una célula troncal hematopoyética pluripotente y luego, por la acción de diferentes citoquinas, se diferencian hasta convertirse en células más especializadas.

A continuación, en la Figura 2, se muestran los componentes celulares y moleculares que ejercen la respuesta inmune innata y adaptativa contra los elementos perjudiciales.

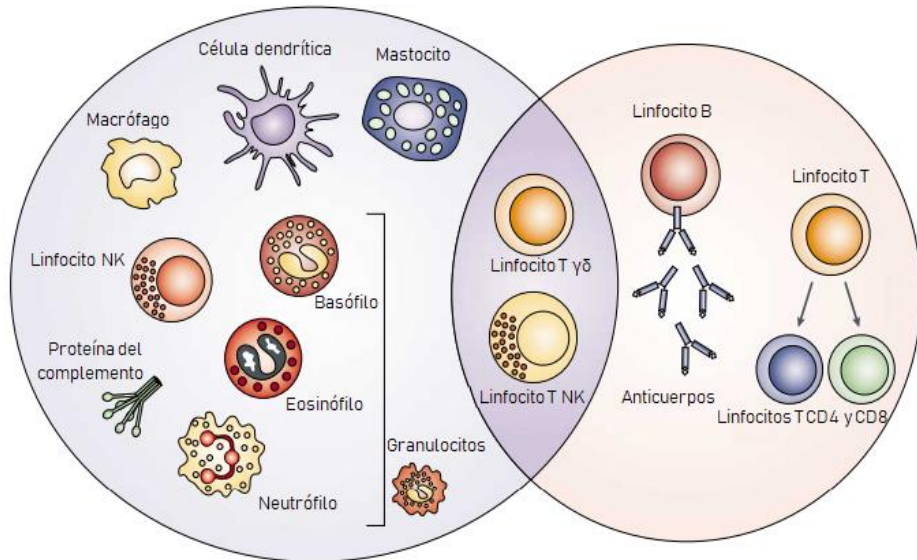


Figura 2. Componentes del sistema inmune. En la elipse de color azul se muestran los pertenecientes al sistema inmune innato y, en la elipse rosa, aquellos del sistema inmune adaptativo o adquirido (adaptado de Dranoff, 2004).

1.3.1. Sistema inmune innato.

El SII supone la primera línea de defensa y además sirve como estímulo para activar la respuesta del SIA. Se caracteriza por ejercer una respuesta rápida pero poco efectiva a través de barreras mecánicas físicas y químicas, componentes celulares como fagocitos o células dendríticas y componentes solubles presente en la sangre.

Las células del SII son capaces de reconocer dos tipos de estructuras moleculares: las que están asociadas a los patógenos o PAMPs (del inglés *pathogen-associated molecular patterns*), que suelen ser ácidos nucleicos de microbios o complejos proteínicos y lipídicos de algunas bacterias; y las estructuras asociadas al daño o DAMPs (del inglés *damage-associated molecular patterns*), como proteínas inducidas por estrés, proteínas nucleares o compuestos que forman cristales. Estas dos clases de estructuras las reconoce el SII a través de los receptores de reconocimiento de patrones o PRR (del inglés *pattern recognition receptors*), que se expresan fundamentalmente en células epiteliales, células dendríticas y fagocitos. La unión de los receptores al ligando desencadena la transducción de la señal en el interior celular, promoviendo respuestas proinflamatorias. Existen diferentes tipos de receptores en función del patrón que se reconozca (Takeuchi y Akira, 2010):

- Receptores tipo Toll o TLR (del inglés *Toll-like receptors*): son glicoproteínas transmembrana de tipo I involucradas en la respuesta a una pequeña variedad de moléculas expresadas por los patógenos. La unión del TLR a su ligando activan la proteína MyD88, que activa el factor de transcripción NF- κ B y produce la síntesis de citoquinas y la posterior respuesta inflamatoria;
- Receptores tipo NOD o NLR (del inglés *NOD-like receptors*): comparten características con los TLR y contienen el dominio NOD (del inglés *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*). Se encuentran en células inflamatorias y células de las barreras epiteliales y reconocen PAMP, DAMP y reclutan otras proteínas para promover la inflamación;
- Receptores tipo RIG o RLR (del inglés *RIG-like receptors*): reconocen ácidos nucleicos de virus e inducen la producción de

IFN-1. Se encuentran en leucocitos y células de tejidos susceptibles de sufrir alguna infección por virus de ARN;

- Otros tipos de receptores son los de carbohidratos y los scavenger, que reconocen moléculas de la superficie de los patógenos e inducen la fagocitosis, o los receptores de péptidos formilados, que reconocen residuos bacterianos que contienen N-formilmetionil.

Por otro lado, el SII también lo componen un conjunto de células y moléculas que tienen, principalmente, funciones defensivas y reparadoras. Se describen a continuación:

- Neutrófilos

Son células polimorfonucleares que se producen a partir del factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y se caracterizan por la presencia de los marcadores de membrana CD11b, CD16, CD18, CD32, CD44 y CD55. Constituyen la mayor parte de los leucocitos circulantes (más del 90% de los granulocitos son neutrófilos) y son la primera línea de defensa en las reacciones de inflamación y las infecciones. Se encargan de destruir microorganismos a través de una serie de mecanismos, principalmente la fagocitosis, liberando enzimas como las lisozimas y sustancias microbidas. Los neutrófilos se pueden encontrar acumulados en el microentorno tumoral, recibiendo el nombre de *neutrófilos asociados al tumor* (del inglés *TAN, tumor-associated neutrophils*) y juegan un papel dual en cáncer ya que, aunque está establecida su función antitumoral como productor de IFN- γ o IL-12, también expresa de forma limitada IL-10, con funciones protumorales (Shaul y Fridlender, 2019).

- Eosinófilos

Son células polimorfonucleares que maduran a partir del factor estimulador de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF). Presentan marcadores de membrana como CD45, CD125, CD66b o CD193. Aunque tienen un papel fagocítico similar al de los neutrófilos, su función principal es la defensa frente a los parásitos y controlan la respuesta inflamatoria frente a éstos gracias a las enzimas que libera. En cáncer tienen un papel dual, ya que en determinadas circunstancias pueden expresar antígenos, promoviendo las respuestas antitumorales a través de la producción de citoquinas proinflamatorias como IFN- γ , TNF- α e IL- 2 y, además, tienen características citotóxicas, ya que expresan los mismos receptores y mediadores que los linfocitos T citotóxicos en el microambiente tumoral (Gatault *et al.*, 2012). Por otro lado, se cree que los eosinófilos pueden promover el crecimiento tumoral a través de la secreción de citoquinas como VEGF o IL-8, que inducen la angiogénesis (Sakkal *et al.*, 2016).

- Basófilos

Suponen una pequeña proporción que, junto con los neutrófilos y los eosinófilos, forma el grupo de los granulocitos, por lo que también son células polimorfonucleares y, además, son muy similares a los mastocitos, ya que pueden ser reclutados en zonas inflamatorias. Algunos de los marcadores que presenta en su superficie celular con CD22, CD123 o una baja expresión de CD45. En cáncer, los basófilos pueden infiltrarse en lugares de inflamación crónica y promover la angiogénesis, porque al expresar receptores para el anticuerpo IgE se produce la liberación del factor VEGF-A (Varricchi *et al.*, 2018).

- Mastocitos

Son células polimorfonucleares que se desarrollan principalmente a partir de la citoquina factor de célula troncal (ligando

de c-Kit) y, al igual que los basófilos, también expresan en su membrana receptores para el anticuerpo IgE. Los marcadores más comunes que se encuentran en la superficie de los mastocitos son CD32, CD33 y CD117. Se encargan de reconocer productos microbianos y producir citoquinas que inducen la inflamación. En el microambiente tumoral también tienen similitudes con los basófilos, ya que el papel de los mastocitos como promotor de la angiogénesis está establecido con la producción de VEGF-A (Varricchi *et al.*, 2017). Se diferencian con respecto a los basófilos en que éstos son circulantes, mientras que los mastocitos residen en el tejido.

- Células dendríticas

Se caracterizan morfológicamente por las prolongaciones que presentan y funcionalmente por ser el grupo celular más especializado de las llamadas *células presentadoras de antígenos* (del inglés APC, *antigen-presenting cells*). Las células dendríticas expresan en su superficie una gran variedad de marcadores como CD11c o HLA-DR y principalmente se encargan de capturar y exponer a los antígenos extraños ante los linfocitos T, de forma que se inicia la respuesta inmune (proceso explicado con más detalle en la sección 1.3.3.). Otra de sus funciones es la producción de proteínas solubles para responder a una infección vírica.

Existen diferentes subpoblaciones de células dendríticas, como las derivadas de monocitos, las plasmacitoides, que son una fuente de interferón tipo I y capturan antígenos en la sangre, y las convencionales, que se encuentran en los epitelios y en los tejidos. Estas últimas, a su vez, pueden ser de tipo I, las cuales realizan una presentación antigénica cruzada a los linfocitos T citotóxicos, y de tipo II, que realizan la presentación a los linfocitos T colaboradores. Las células dendríticas también presentan un papel dual en la progresión tumoral: es evidente que la infiltración de estas células en el tumor activa la respuesta

inmune al ejercer su función como APC, aunque también se ha demostrado en modelos murinos que la liberación de factores como PGE2 y TGF- β le confiere a las células dendríticas funciones inmunosupresoras (Liu *et al.*, 2009) o que algunas citoquinas, como la propia TGF- β , la IL-2 o la IL-10, estimulan a las células dendríticas para la formación de linfocitos T reguladores (Ramos *et al.*, 2013), los cuales promueven el desarrollo y la progresión tumoral.

- Macrófagos

Surgen a partir del factor estimulador de colonias de monocitos (M-CSF) y participan durante las reacciones inflamatorias. Inicialmente, los monocitos, que expresan el marcador CD14, entran en la sangre y migran hacia los tejidos, donde se convierten en macrófagos, que expresan en su superficie marcadores como CD11b, CD68 o CD163. Se encargan de ingerir células muertas o microbios, porque expresan receptores que reconocen específicamente los patrones PAMP. También actúan como APC y secretan diferentes citoquinas para promover el reclutamiento de monocitos. Cuando se encuentran en el microambiente tumoral, los macrófagos reciben el nombre de macrófagos asociados al tumor (del inglés TAM, *tumor-associated macrophages*) y son capaces de inhibir o promover el crecimiento y la propagación tumoral dependiendo de su estado de activación: los macrófagos M1 activados tienen una alta expresión de IL-12 y una baja de IL-10, por lo que pueden destruir células tumorales; sin embargo, los macrófagos de fenotipo M2 pueden promover el crecimiento tumoral al alterar el microambiente tisular y suprimir las respuestas del linfocito T secretando mediadores como la IL-10 y tener una baja expresión de IL-12. También secretan quimiocinas como CCL17/TARC y CCL22/MDC, que ayudan al reclutamiento de eosinófilos, basófilos y linfocitos T reguladores y promueven la angiogénesis tumoral secretando citoquinas como VEGF y TGF-P (Galdiero *et al.*, 2013).

- Células linfoides innatas

Comprenden un grupo de células que se caracterizan por su morfología linfocítica clásica y, a diferencia de los linfocitos T, no expresan receptores para el reconocimiento específico de antígenos. Aquellas que presentan características no citotóxicas son las ILC1 (del inglés *innate lymphoid cell*), que presentan funciones inmunes contra bacterias intracelulares, protozoos e inflamación crónica; las ILC2, contra helmintos e intervienen en enfermedades como el asma o la alergia; y las ILC3, contra bacterias extracelulares o inflamación crónica (Annunziato, Romagnani y Romagnani, 2015; Artis y Spits, 2015). Las células linfoides innatas más conocidas son las células NK (del inglés *Natural Killer*), también llamadas linfocitos citolíticos naturales. Presentan en su membrana marcadores como CD56 o CD94 y receptores de activación o inhibición codificados por el ADN en línea germinal para distinguir las células infectadas de las sanas: cuando una célula expresa en su superficie moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*), como ocurre en las células sanas, los receptores de los linfocitos NK las reconoce y no destruye a las células. En caso contrario, se activan y liberan perforinas y granzimas que inician una cascada de señales que producen la muerte por apoptosis de las células infectadas. También existen linfocitos NK sin función citotóxica que se encargan de producir IFN- γ , que activa a los macrófagos para que destruyan a los microbios fagocitados.

En el microambiente tumoral, la presencia de linfocitos NK resulta ser favorable para el individuo debido a las funciones citotóxicas que presentan, aunque en determinadas ocasiones las células tumorales son capaces de evadir su ataque a través de dos mecanismos (Vitale *et al.*, 2014): por un lado, a través de la liberación de citoquinas como TGF- β , IL-2 o IL-4 por parte de células que promueven la progresión tumoral, como los linfocitos T reguladores y

las células supresoras de origen mieloide, que reducen la habilidad de los linfocitos NK para ejercer su función citotóxica. Por otro lado, a través de la presencia de células tumorales poco inmunogénicas, que podrían presentar una expresión alterada de sus ligandos para los receptores de los linfocitos NK y desfavorecer la respuesta inmune de este conjunto celular.

- Sistema de complemento

Es un grupo de proteínas sintetizadas mayoritariamente en el hígado, muchas se encuentran en el suero como precursores enzimáticos y otras en las superficies celulares. Estas proteínas interactúan entre sí de manera regulada promoviendo respuestas antiinflamatorias que ayudan a combatir la infección del huésped. Suponen un puente entre la inmunidad innata y la adquirida porque aumentan las respuestas de los anticuerpos y la memoria inmune, lisan microorganismos o células diana y eliminan complejos inmunitarios y células apoptóticas. Se conocen tres vías de activación del sistema del complemento: la vía clásica, la alternativa y la vía de las lectinas, que se diferencian tanto en el mecanismo desencadenante de la activación como en sus componentes iniciales. El único punto común de las tres es la formación de una enzima, la C3 convertasa, que produce la destrucción de patógenos y células extrañas. En cáncer, a pesar de que el interés de las inmunoterapias se centra en la respuesta de los linfocitos T, es importante también el estudio del sistema de complemento por formar parte de la respuesta inflamatoria, que está relacionada con la tumorigénesis y la progresión tumoral, y por poder regular la respuesta antitumoral de los linfocitos T (Afshar-Kharghan, 2017).

- Anticuerpos naturales

Son moléculas que también ayudan a combatir patógenos. A diferencia de los anticuerpos generados por la respuesta adaptativa, los

naturales se encuentran de forma fisiológica en el organismo recorriendo el torrente sanguíneo y ayudan a la activación del sistema de complemento. Algunos de los anticuerpos que se encuentran de forma natural son las pentraxinas, las colectinas o las ficolinas.

1.3.2. Sistema inmune adaptativo.

El SIA genera una respuesta bastante más específica que el SII y además tiene la capacidad de crear memoria inmunológica, es decir, de preparar diferentes mecanismos protectores para actuar de una forma más rápida frente al mismo patógeno en el futuro. El tiempo de generación de la respuesta adaptativa es mayor que la innata, ya que incluye procesos que generarán una serie de receptores y células específicos para el patógeno que se quiere destruir. Dependiendo de los efectores que participen en la respuesta inmune, el sistema adaptativo del individuo puede ser celular, si intervinieran las células que lo componen, o humoral, si lo hacen moléculas presentes como los anticuerpos o el sistema de complemento.

Los componentes celulares del SIA son los linfocitos T y B y, junto con los linfocitos NK, tienen mucha trascendencia en la inmunología del cáncer porque se han encontrado una gran cantidad de estas células en el microambiente tumoral, donde reciben el nombre de linfocitos infiltrantes del tumor o TIL (del inglés *tumor-infiltrating lymphocytes*). Los TIL actualmente podrían aportar información clínica relevante como marcador pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento en varias clases de tumores, como en el cáncer de mama (de la Cruz-Merino *et al.*, 2019).

En la Figura 3 se muestra la relevancia que podrían tener los TIL en cáncer, ya que la mayoría de estas células parecen tener el potencial

suficiente como para hacer frente a las células malignas, por lo que se hace imprescindible su estimulación a través de las inmunoterapias para aumentar y mejorar la eficacia de la respuesta inmune contra el tumor.

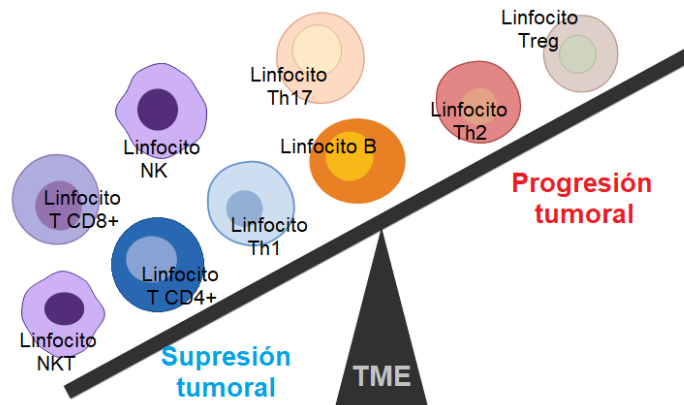


Figura 3. Papel de los linfocitos infiltrantes del tumor en el microambiente tumoral. Los TIL desempeñan un papel dual en el microambiente debido a su participación tanto en la eliminación como en el posible avance del tumor, procesos también condicionados por el reclutamiento de otras especies como los TAM o las células supresoras de origen mieloide y la producción de citoquinas como IL-1, IL-6 o TNF- α , que inclinarían la balanza hacia la progresión tumoral. TME, microambiente tumoral; NK, linfocito citolítico natural; NKT, linfocito T citolítico natural; Th, linfocito T colaborador, Treg, linfocito T regulador (elaboración propia).

Los tipos y subtipos más importantes de linfocitos se detallan a continuación:

- Linfocitos T

Surgen en la médula ósea y maduran en el timo. Se caracterizan por expresar marcadores CD3 en su superficie celular y se encargan de reconocer péptidos de proteínas extrañas que están unidas a moléculas

del MHC. Las respuestas inmunes mediadas por los linfocitos T controlan el desarrollo y la progresión de los tumores malignos (den Broek, Borghans y Wijk, 2018; Kumar, Connors y Farber, 2018).

El principal mecanismo de protección antitumoral es la muerte celular, que está mediada por los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL, del inglés *cytotoxic T lymphocyte*), ya que tienen la capacidad de reconocer y destruir células potencialmente malignas que expresen péptidos derivados de antígenos tumorales y los presenten asociados a moléculas del MHC-I por las APC, como las células dendríticas, los linfocitos B o los macrófagos.

Por otro lado, los linfocitos T cooperadores CD4⁺ (Th, del inglés *T helper*) participan en las respuestas inmunitarias antitumorales reconociendo antígenos asociados al MHC-II y proporcionando citoquinas para la diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ vírgenes en CTL efectores y de memoria y la proliferación de éstos, así como la activación de linfocitos B y macrófagos. Los linfocitos T CD4⁺ específicos de antígenos tumorales secretan citoquinas como TNF- α e IFN- γ , que pueden aumentar la expresión del MHC-I por las células tumorales. Existen diferentes clases de linfocitos T CD4⁺ dependiendo del tipo de patógeno al que se enfrenten (Zhu, Yamane y Paul, 2010; Annunziato, Romagnani y Romagnani, 2015). Los más importantes son los siguientes:

- Linfocitos Th1: se encargan de la respuesta inmune contra patógenos intracelulares y participan en la resistencia a infecciones microbacterianas, aunque también son responsables del desarrollo de algunas enfermedades autoinmunes. Suelen secretar IFN- γ , para la activación de macrófagos, e IL-2, importante para generar linfocitos Th1 de memoria.

- Linfocitos Th2: juegan un papel importante en la defensa contra parásitos extracelulares, aunque también participan en enfermedades alérgicas. Producen IL-4, útil para la estimulación de la expresión de IgE en los linfocitos B, IL-5, para el reclutamiento de eosinófilos, o IL-10, que suprime la función de los linfocitos Th1.
- Linfocitos Th17: ejercen la respuesta inmune contra hongos y bacterias extracelulares. Su papel en cáncer mediado por IL-17 es dual: esta citoquina ha demostrado estar relacionada con el aumento de la actividad citotóxica de los linfocitos NK o con la activación de algunas células que generan IL-6, que incrementa la función de los linfocitos T citotóxicos. Sin embargo, IL-17 también parece regular la producción de la quimioquina CCL17, que permite la infiltración de linfocitos T reguladores en el microambiente tumoral, o la diferenciación de macrófagos al fenotipo M2 (Asadzadeh *et al.*, 2017).

También existe una subpoblación de linfocitos T CD4⁺ reguladores (Treg) caracterizados por expresar el marcador CD25 en su superficie celular y la proteína intracelular Foxp3. Controlan la tolerancia inmune suprimiendo la función de los linfocitos T, ya que de lo contrario el SI seguiría activo tras la respuesta inmune contra el patógeno o célula tumoral. Aunque su papel en el cáncer genera controversia, los linfocitos Treg parecen promover la progresión tumoral. Los linfocitos Treg se explican con más detalle en la sección 1.3.6.2. Por otro lado, también existen pequeñas subpoblaciones de linfocitos T que son de tipo NK, con características citotóxicas, y subpoblaciones de linfocitos T $\gamma\delta$, que se encuentran principalmente en el epitelio, donde desarrollan su función antitumoral, que es cooperadora y citotóxica.

- Linfocitos B

Los linfocitos B derivan de la médula ósea, expresan el marcador de superficie CD19 y son los únicos capaces de producir anticuerpos. En el microambiente inmune los linfocitos B pueden inhibir y promover el crecimiento tumoral: por un lado, tienen la capacidad de eliminar células tumorales a través de proteínas líticas como el TFN- α o la granzima B; por el otro, existe una subpoblación de linfocitos B reguladores (Bregs) que tienen la capacidad tanto de captar al antígeno tumoral y presentarlo procesado a los linfocitos T para favorecer la eliminación de células tumorales como de promover el crecimiento tumoral y la metástasis a través de la producción de citoquinas como IL-10 y TGF- β . Esto favorece la inhibición de la respuesta inmune de los linfocitos Th1, lo que se traduce en un incremento en el microambiente tumoral de determinadas subpoblaciones supresoras negativas, como los linfocitos T reguladores y las células mieloides. Por otro lado, tanto los linfocitos T como B tienen la capacidad de generar células de memoria tras su activación inicial, lo que les permite actuar en el futuro de forma más eficaz que los linfocitos inmaduros si volviera a aparecer la misma infección, ya que presentan anticuerpos más específicos contra el antígeno y responden con mayor rapidez y eficacia.

En el SIA existen dos vías diferentes de respuesta a los patógenos o células tumorales en función de los elementos que actúen:

- La respuesta adaptativa celular, que requiere la activación de los linfocitos T. El primer paso para que esto ocurra es la presentación del antígeno del patógeno o célula tumoral por parte de la APC y el reconocimiento de éste por parte del linfocito T. Aunque prácticamente todas las células del SI pueden actuar como una APC, las más importantes son las células dendríticas, los linfocitos B y los macrófagos. El proceso

de reconocimiento antigénico que inicia la respuesta inmune se explica más detalladamente en la sección 1.3.3.

- La respuesta adaptativa humoral, que se lleva a cabo a través de la activación de los linfocitos B tras el reconocimiento antigénico por parte de su receptor de membrana específico, el BCR (del inglés *B cell receptor*). Una vez activados, los linfocitos B proliferan y muchos se diferencian en células que secretan anticuerpos con la misma zona de unión al antígeno que el BCR que los reconoció al principio. Los anticuerpos secretados se denominan inmunoglobulinas y pueden presentar diferentes funciones, como las IgM, IgG, IgA o IgE. La respuesta humoral se lleva a cabo tras la unión de los anticuerpos a los microbios; por ejemplo, las inmunoglobulinas IgG e IgM activan al sistema de complemento para la fagocitosis de los microbios y la IgA los neutraliza en las superficies de las mucosas.

1.3.3. El inicio de la respuesta inmune.

La función principal de los linfocitos T es ejercer una respuesta inmune activa contra patógenos o células tumorales que pueden localizarse en cualquier parte del individuo. Por tanto, es necesaria la ayuda de un conjunto de células que capturen, transporten y presenten los antígenos extraños a los linfocitos T. Estos grupos especializados son las APC y principalmente son las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos B.

Las APC se encuentran en los capilares linfáticos de la piel, el epitelio de la mucosa y los órganos parenquimatosos, donde se encargan de capturar los péptidos de los antígenos, previamente degradados por proteosomas. Al expresar el receptor de quimiocinas CCR7, que regula los mecanismos moleculares necesarios para dirigir

a los receptores de membrana a los ganglios linfáticos, las APC son capaces de migrar hacia allí transportando los péptidos para exponerlos ante los linfocitos. Al mismo tiempo, los linfocitos T vírgenes necesitan ser activados para iniciar la respuesta inmune y recorren el torrente sanguíneo y los órganos linfoides secundarios hasta encontrar una APC que tenga el péptido necesario. Como explican Blum, Wearsch y Cresswell (2013), la presentación del antígeno está mediada por las moléculas MHC de clase I y II (en los humanos reciben el nombre de HLA, antígeno leucocitario humano, del inglés *human leukocyte antigen*), que se encuentran en la superficie de las APC y se encargan de presentar péptidos de pequeño tamaño a los linfocitos T, que los reconocerán a través de sus TCR (del inglés *T cell receptor*). Las moléculas del MHC-I reconocen péptidos intracelulares y los presentan a los linfocitos T citotóxicos, mientras que las moléculas del MHC-II reconocen péptidos extracelulares y los presentan a los linfocitos T colaboradores.

También existe otro mecanismo de presentación del antígeno denominada presentación cruzada, en la que se emplea la vía del MHC-I para exponer ante los linfocitos T CD8⁺ los péptidos de antígenos extracelulares (Joffre *et al.*, 2012). La presentación cruzada suele ocurrir en presencia de muchas clases de virus, bacterias y en muchos tipos de tumores, por lo que este tipo de presentación antigénica es de vital importancia en la inmunidad antiviral y antitumoral.

Para que ocurra la respuesta inmune son necesarias tres condiciones que no deben ocurrir de forma aislada, sino conjunta:

1. La interacción entre el TCR de los linfocitos T y los MHC que portan el péptido del antígeno, espacio virtual denominado sinapsis inmunológica, cuya misión es generar un sitio estable de unión entre el linfocito T y la APC.

2. La unión entre los receptores de la familia CD28 de los linfocitos T y los receptores de la familia B7 de las APC activadas, proceso denominado coestimulación. Los coestimuladores B7 aseguran que la respuesta inmune de los linfocitos T se lleve a cabo únicamente cuando sea necesario. Las moléculas de la familia CD28 actúan para asegurar la supervivencia, proliferación y diferenciación de linfocitos T; para ellos, existen tanto receptores inhibidores como activadores de respuesta: algunos de los receptores inhibidores son CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*) y PD-1 (*programmed death 1*), que se explican más detalladamente en la sección 1.3.6.1., mientras que los receptores activadores son OX40, que se une a su ligando OX40L expresado en las APC, CD27, que se une a CD70, o LFA-1, que se une a ICAM-1/2, entre otros.
3. Señales generadas tras la interacción entre las citoquinas solubles y los receptores de membrana de los linfocitos T y las APC.

1.3.3.1. Tipos de antígenos tumorales.

Los antígenos que son capaces de reconocer las APC para iniciar la respuesta inmune se dividen en dos grupos:

1. Antígenos específicos de tumores, que aparecen únicamente en células tumorales. Pueden ser los siguientes:
 - Antígenos específicos compartidos por diferentes tumores, como el MAGE-1, expresado en melanoma, cáncer de hígado, pulmón o vejiga. Otros genes sólo se expresan en un tipo de tumor, como GAGE o BAGE en cáncer de testículo.

- Neoantígenos. Son proteínas resultantes de mutaciones que sufren los protooncogenes y los genes supresores de tumores.
 - Antígenos virales, como el E7 del virus VPH-16, que se encuentra en el cáncer del cuello uterino
2. Antígenos asociados a tumores, que se dan tanto en las células tumorales como en las normales. Son los siguientes:
- Antígenos específicos de los tejidos. Por ejemplo, la tirosinasa es una enzima que está expresada en melanocitos sanos y melanomas.
 - Antígenos que se encuentran sobreexpresados. Son antígenos semiespecíficos del tumor, ya que están formados por proteínas codificadas por genes que no están mutados pero su expresión en el tumor es muy elevada, por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico HER2.
 - Antígenos oncofetales o embrionarios. Se expresan en células tumorales y en los tejidos que están en desarrollo, pero no en los tejidos normales de los adultos. Los más importantes son la α -fetoproteína y el antígeno carcinoembrionario.
 - Antígenos de diferenciación. Por ejemplo, el antígeno prostático específico se expresa en el epitelio prostático normal y tumoral.

1.3.4. La inmunoección del cáncer.

El cáncer se caracteriza por la autonomía que presenta, es decir, por la ausencia de una respuesta apropiada a los mecanismos reguladores de la diferenciación y la proliferación celular. Esta

enfermedad se forma a partir de la acumulación progresiva de lesiones genéticas, como una mutación o la delección de un gen supresor, en las células más diferenciadas y activadas y afecta a los protooncogenes y a los genes supresores de tumores.

En este sentido, el sistema inmune es capaz de efectuar una defensa activa contra patógenos o tumores. Esta idea, propuesta por Paul Ehrlich en 1909, no fue evidenciada hasta finales de los años 50, cuando se publicó un trabajo que indicaba que las células tumorales presentaban antígenos capaces de activar una respuesta inmune que además generaba memoria. A partir de ahí empezaron a adquirir importancia los antígenos tumorales y a lo largo de estos años se han diseñado diferentes estrategias basadas en encontrar los antígenos adecuados que estimulen el SI para combatir el tumor. Años más tarde, la idea de que el sistema inmune ejerce una defensa activa contra los tumores fue ampliada con el concepto de inmunovigilancia tumoral (Burnet, 1970; Thomas, 1982), por el cual el sistema inmune era capaz de prevenir el desarrollo del tumor, actuando como un supresor extrínseco. Tal como se observa en la Figura 4, en los seres humanos el desarrollo y la progresión tumoral consiste en un proceso de varios pasos que requiere la adquisición de seis capacidades biológicas, conocidas como los pilares o *hallmarks* del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2000):

1. Mantenimiento de la señalización proliferativa.
2. Evasión de los mecanismos supresores del crecimiento.
3. Resistencia a la muerte celular.
4. Permitir la inmortalidad replicativa.
5. Inducir la angiogénesis
6. Producir metástasis.

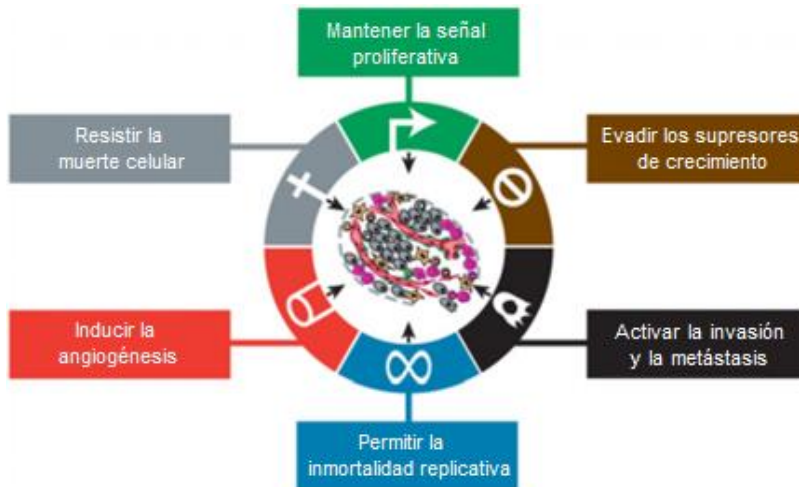


Figura 4. Los *hallmarks* del cáncer propuestos originalmente para explicar el desarrollo y la proliferación tumoral (adaptado de Hanahan y Weinberg, 2000).

Los *hallmarks* propuestos por Hanahan y Weinberg no mencionaban la interacción entre las células tumorales y las del sistema inmune. Así, dos años más tarde, se definió un nuevo *hallmark* del cáncer basado en investigaciones que apoyaban la idea de que el sistema inmune podría tener un rol principal en la prevención del desarrollo tumoral (Dunn *et al.*, 2002). Ese nuevo *hallmark* fue la inmunoedición, que era una hipótesis que explicaba un mecanismo que ampliaba la idea de la inmunovigilancia tumoral, ya que algunas células tumorales tenían la capacidad de escapar de la inmunovigilancia y permitía conocer de una mejor forma las interacciones que tienen lugar entre el SI y el tumor. Para explicar esta hipótesis, se propuso que el desarrollo tumoral podría producirse de forma potencial a través de tres fases donde también intervenían factores externos como el estrés ambiental o el deterioro del sistema inmune. Las etapas de las que consta la inmunoedición se observan en la Figura 5 y son las siguientes:

- Fase de eliminación

Esta es la etapa correspondiente a la inmunovigilancia tumoral propuesta por Burnet y Thomas, en la que se encuentran involucradas tanto la defensa innata como adaptativa del sistema inmune. Esta fase comienza cuando el tumor va creciendo en el tejido hasta que necesita la irrigación sanguínea para seguir proliferando, por lo que se producen mecanismos como la angiogénesis y la remodelación de la matriz extracelular. Esto desencadena una serie de procesos inflamatorios mediados por los componentes del SII con el fin de eliminar las células tumorales, entre los que destaca la liberación de IL-12 o IFN- γ , por lo que las APC serán capaces de captar los antígenos tumorales y presentarlos a los linfocitos T, los cuales migran al tumor, reconocen sus células y las eliminan. La muerte celular libera más antígenos tumorales, por lo que las APC repiten el proceso de captación y presentación antigénica a los linfocitos T. Este proceso se conoce como ciclo cáncer-inmunitario y es muy importante porque si el sistema inmune es capaz de eliminar completamente el tumor se producirá la regeneración del tejido dañado por la inflamación, dándose por terminada la respuesta inmune. En caso contrario, si el tumor presenta una serie de mecanismos para evitar la eliminación será capaz de avanzar a la siguiente etapa.

- Fase de equilibrio.

En esta etapa se mantiene la respuesta inmune frente al tumor. Aunque el SIA es incapaz de eliminar completamente las células tumorales porque éstas han desarrollado una serie de mecanismos que provocan resistencia inmune, las que consigue destruir son altamente inmunogénicas, lo que permite al SIA moldear la inmunogenicidad del tumor (Aragón-Sanabria, Kim y Dong, 2018). En el supuesto caso de una eventual eliminación se produciría un retorno a la homeostasis del tejido normal, similar a la fase anterior. Entre los mecanismos para evadir el SI destacan la pérdida de antígenos tumorales por mutación,

ausencia de componentes del MHC de clase I, insensibilidad a IFN- γ o la inhibición de la respuesta de los linfocitos NK. Como estos mecanismos se enfrentan a los mecanismos de defensa que intenta desarrollar el SI se dice que hay una situación de equilibrio o de latencia controlada por el SI. También se da la circunstancia de que esta fase suele ser de larga duración, ya que de forma continua hay conjuntos de células tumorales que son eliminadas porque no son inmunorresistentes y otras no son sensibles a la eliminación, por lo que proliferan, se desarrollan tumores menos inmunogénicos e inducen un estado sistémico de inmunosupresión antitumoral a través de mecanismos asociados al proceso inflamatorio y conocidos como mecanismos de escape.

- Fase de escape.

Hasta esta etapa avanzan los tumores que no pueden ser reconocidos y eliminados por el SII y el SIA en las fases anteriores. Las células tumorales se caracterizan en esta fase por tener un fenotipo poco inmunogénico que han ido desarrollando a lo largo de las etapas anteriores, por lo que se vuelven insensibles a la acción del sistema inmune y proliferan, secretan factores solubles que favorecen la inmunosupresión y la angiogénesis, se diseminan en el organismo y crecen progresivamente hasta que son visibles y se desarrolla metástasis (Schreiber, Old y Smyth, 2011). Entre los mecanismos que emplean las células tumorales para establecer un estado sistémico de inmunosupresión antitumoral se encuentran la pérdida definitiva de antígenos tumorales, que se relaciona con un aumento de las citoquinas IL-10 y TGF- β , que promueven la diferenciación de los linfocitos T a reguladores, y una alteración de la mielopoiesis, que deriva en defectos de las células presentadoras de antígenos y la acumulación de células supresoras de origen mieloide (Gabrilovich y Nagaraj, 2009; Gabrilovich, Ostrand-Rosenberg y Bronte, 2012). Además, las células tumorales también pueden evitar el reconocimiento

inmune a través de la expresión de los receptores de inmunosupresión, como PD-1 o CTLA-4, o la producción de citoquinas que promuevan la angiogénesis (Mittal *et al.*, 2014).

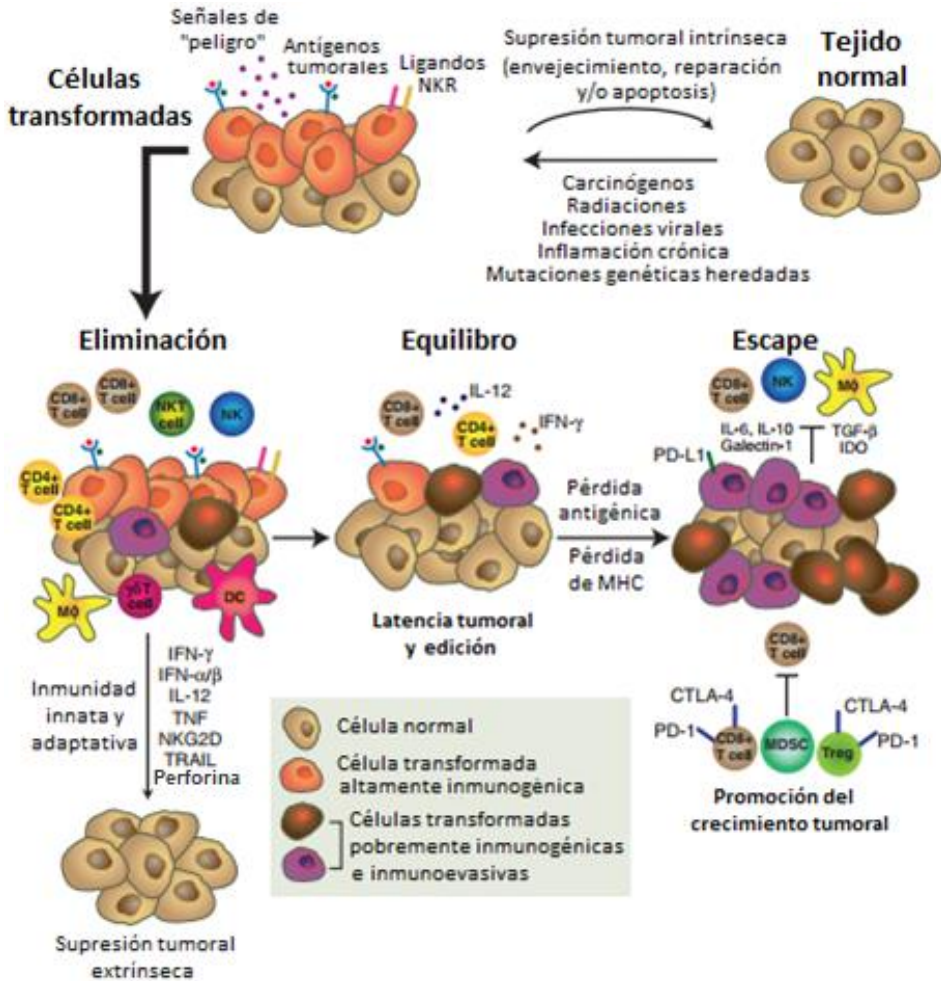


Figura 5. Etapas de la inmunoedición del cáncer. En la fase de eliminación ocurren las respuestas de los SII y SIA para cortar la progresión tumoral, en la fase de equilibrio participa el SIA y se mantiene la latencia tumoral, y en la fase de escape empieza a manifestarse clínicamente el tumor (adaptado de Schreiber *et al.*, 2011).

La fase de escape ha sido un área de intensa investigación en el campo de la inmunología tumoral en las últimas décadas. De hecho, actualmente sigue siendo un área de interés científico y se está trabajando en el diseño de diferentes estrategias terapéuticas que puedan dirigirse a estos mecanismos de escape. A estos tratamientos se les denominan comúnmente como inmunoterapias.

Con el objetivo de profundizar en el concepto de la inmunoedición, se observó que la inestabilidad y mutación del genoma y la inflamación promotora del tumor facilitaban la adquisición de dos nuevos *hallmarks*, como se observa en la Figura 6, que son la desregulación del ciclo celular y la evasión de la destrucción de las células tumorales a partir del sistema inmune (Hanahan y Weinberg, 2011).

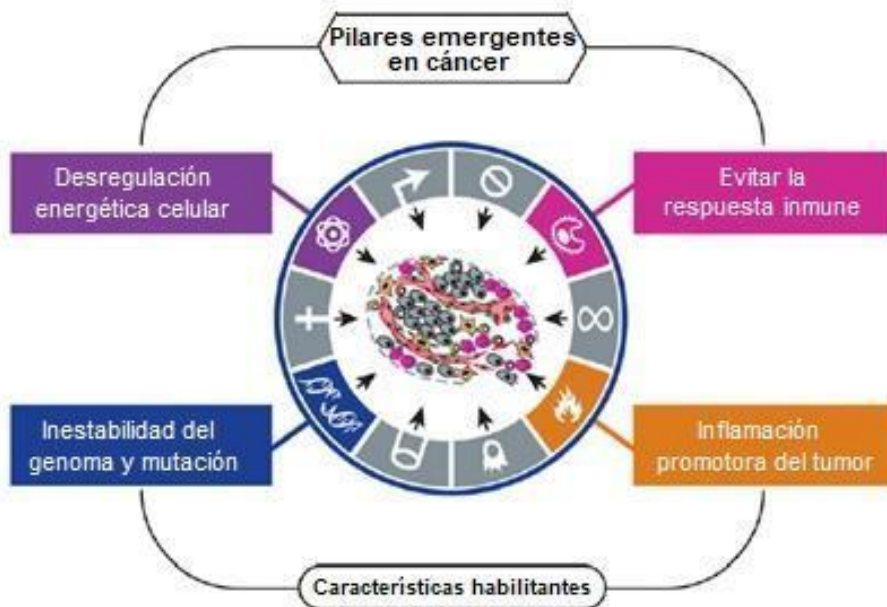


Figura 6. Nuevos *hallmarks* del cáncer y características que facilitan su adquisición (adaptado de Hanahan y Weinberg, 2011).

1.3.5. Inmunoterapia.

La inmunoterapia ayuda a estimular el SI del individuo con la finalidad de intentar eliminar aquellas células tumorales que han logrado sobrepasar los mecanismos de defensa del SII y el SIA durante las fases de eliminación y equilibrio de la inmunoección, con la finalidad de seguir proliferando y ejerciendo su función inmunosupresora. El motivo principal por el cual actualmente se emplean inmunoterapias en cáncer es que los tratamientos convencionales se basan en destruir células en división o que bloquean la división celular, sin hacer una distinción entre las células sanas o las malignas, por lo que es evidente que también podrían tener efectos perjudiciales en el paciente. En cambio, la inmunoterapia potencia al SI para que sea éste el que destruya el tumor.

Como explican Ruttinger *et al.*, 2010, las inmunoterapias se dividen en tres bloques diferentes:

- Inmunización activa.

Se emplean las vacunas como terapias inmunológicas ya que están diseñadas para antígenos tumorales específicos. La mayoría de los esfuerzos en el desarrollo de inmunoterapias se han centrado en las vacunas porque históricamente han aportado grandes beneficios médicos. De hecho, las vacunas se han desarrollado para emplear diferentes componentes: algunas utilizan moléculas proinflamatorias para potenciar el número de células dendríticas activadas, otras emplean directamente las células dendríticas de los pacientes para incubarlas con antígenos tumorales y volverlas a inyectar y otro de los métodos emplea ADN y vectores víricos que codifican antígenos tumorales. La eficacia de las vacunas inmunoterápicas ha resultado ser limitada cuando se han dirigido a antígenos tumorales que comparten los pacientes y, sin embargo, a pesar de la dificultad de diseñar vacunas personalizadas, éstas han demostrado tener un gran potencial, como

se ha demostrado en melanoma (Carreño *et al.*, 2015; Ophir *et al.*, 2016).

- Inmunización pasiva.

Una de las inmunoterapias pasivas es la terapia celular adoptiva, que consiste en extraer las células T citotóxicas que han invadido el tumor del paciente para seleccionar las de mayor actividad antitumoral y cultivarlas, activarlas con citoquinas y finalmente volverlas a administrar al paciente. Existen varios tipos de transferencia celular adoptiva, destacando sobre todo la terapia CAR (del inglés *chimeric antigen receptor*), que consiste en añadir a los linfocitos T cultivados receptores de antígenos quiméricos, desarrollados en el laboratorio, para que cuando los linfocitos T sean administrados de nuevo sean capaces de reconocer de forma específica una proteína o antígeno tumoral, unirse a él y destruirlo (Bonini y Mondino, 2015).

Otro método bastante prometedor de inmunoterapia pasiva es el bloqueo del punto de control, también denominados *checkpoints*. Los puntos de control son receptores que generan señales que inhiben la función de los linfocitos T y los aprovechan las células tumorales como vía de escape para evadir la inmunovigilancia. Los puntos de control más destacados son los de PD-1 y CTLA-4 (Park *et al.*, 2019). Se explicarán con más detalles en la sección 1.3.6.1.

- Inmunoestimulación.

Se emplean anticuerpos y moléculas pequeñas para el tratamiento de tumores malignos mediante la activación de una respuesta inmune endógena contra las células tumorales. Algunos ejemplos son el uso de citoquinas para estimular la activación de células dendríticas y linfocitos T frente al tumor o la estimulación inespecífica del SI mediante administración de sustancias inflamatorias o que actúen como activadores policlonales de los linfocitos.

Actualmente, ha quedado demostrada la eficacia de la inmunoterapia en términos de impacto de supervivencia global en una gran variedad de tumores con origen biológico y comportamiento clínico diferentes. La estimulación del SI y el beneficio que aporta al paciente hace necesario un estudio detallado de su microambiente tumoral y tratar de mejorar el efecto de tratamientos como la quimioterapia a través de la combinación con inmunoterapias (de la Cruz-Merino *et al.*, 2017).

1.3.6. El inmunoescape tumoral.

1.3.6.1. Tipos de antígenos tumorales.

Las moléculas inhibitoras más importantes que suprimen la respuesta inmune son los *checkpoints* o puntos de control. Surgen de la unión de un receptor, que normalmente se encuentra expresado en los linfocitos T, y su ligando, que puede estar expresado en la superficie de las APC o en células tumorales. Actualmente se están probando diferentes inmunoterapias pasivas que actúan bloqueando esta unión, lo que se traduciría en una disminución de células tumorales porque los linfocitos T podrían ejecutar una respuesta inmune adecuada. Los puntos de control más destacados se muestran en la Figura 7 y se explican a continuación:

- CTLA-4

Se trata del receptor de membrana CD152, que se encuentra en la superficie de los linfocitos T. Se une específicamente a los receptores de la familia B7, expresados en la superficie de las APC y son CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) (Collin, 2016). Cuando CTLA-4 se une a los receptores B7 se produce la desactivación de los linfocitos T. La

molécula CTLA-4 también está expresada en linfocitos T reguladores y linfocitos T CD4 y CD8 activados. Cuando sus ligandos de la familia B7 se unen a él se suprime la proliferación de linfocitos T citotóxicos y se reduce la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-2, con efectos antitumorales.

En cáncer, el bloqueo de CTLA-4 se lleva a cabo a través de un anticuerpo antagonista que evita la unión a sus ligandos y mantiene la función linfocitaria antitumoral. Los fármacos anti-CTLA-4 más exitosos clínicamente son ipilimumab, que fue el primero en tener la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) tras los buenos resultados en melanoma, y tremelimumab (Pianko *et al.*, 2017; Webb *et al.*, 2018). Sin embargo, el bloqueo de CTLA-4 con ipilimumab puede inducir eventos adversos, como colitis, hepatitis, dermatitis o enfermedades autoinmunes, lo cual se ha observado en un ensayo clínico fase III hasta en un 60% de los pacientes con melanoma avanzado a los que se le administró el fármaco (Weber *et al.*, 2013; Haanen y Robert, 2015).

- PD-1

Es el receptor de membrana CD279 y se encuentra sobre la superficie de los linfocitos T. Cuando sus ligandos PD-L1 o PD-L2, que se encuentran en las APC, se unen a PD-1 se inhibe la función de los linfocitos T y son incapaces de reconocer y destruir las células tumorales. Como los ligandos de PD-1 también pueden expresarse en células tumorales, estarán sobreexpresados si hay mucha proliferación de este tipo de células y se producirá la inhibición de las respuestas inmunes (Collin, 2016). El bloqueo de este punto de control con fármacos anti-PD-1 permite la actividad citolítica de los linfocitos T (Haanen y Robert, 2015) y ha demostrado ser clínicamente beneficioso en diferentes tipos de tumores, como en cáncer de pulmón no microcítico y melanoma, tal como explican Sunshine y Taube, 2015. Los fármacos más destacados de la familia de los anti-PD-1 son

pembrolizumab y nivolumab, que han demostrado ser los más exitosos en enfermedades hematológicas (Pianko *et al.*, 2017).

También se ha probado la combinación de terapias anti-CTLA-4 y anti-PD-1, lo cual ha tenido bastantes buenos resultados en comparación con el uso individual. En estudios preclínicos se ha observado un aumento de los TIL y el aumento y la mejora de la función de los linfocitos efectores contra el tumor. La inmunoterapia con ipilimumab y nivolumab se ha probado en diferentes ensayos clínicos de melanoma, donde ha habido un alto porcentaje de respuestas clínicas objetivas (entre un 40 a 60%), lo que demuestra que la combinación de fármacos para la inhibición de los puntos de control es más beneficiosa que el uso de las terapias por separado (Haanen y Robert, 2015).

- TIM3

Se trata de un receptor expresado en linfocitos colaboradores Th1 y suprime la activación de estas células cuando se une a su ligando, la galectina-9, que se expresa en células linfocidas, eosinófilos, células dendríticas o macrófagos, entre otras (Elahi *et al.*, 2012). Los fármacos anti-TIM3 bloquean a este receptor y han sido varios los fármacos ya patentados, aunque con datos limitados sobre su eficacia (Collin, 2016).

- LAG3

El gen 3 de activación de linfocitos se encuentra expresado en linfocitos T activados, B y NK, así como en células dendríticas plasmocitoides. El ligando al que se une es el MHC de clase II y, aunque la función de esta interacción no es clara, se sabe que los fármacos que bloquean este punto de control promueven la proliferación de linfocitos T (Collin, 2016).

- TIGIT

Se trata de una proteína transmembrana de tipo 1 que se encuentra expresada en linfocitos T y NK y se une a su ligando PVR (CD155), se encuentra expresado en APC. En cáncer, TIGIT se ve aumentado en los TIL diversos tipos de tumores, disminuyendo la capacidad de respuesta linfocitaria. Los tratamientos anti-TIGIT tienen poco efecto, aunque se ha demostrado que la combinación con fármacos anti-PDL1 mejoran la respuesta antitumoral (Collin, 2016).

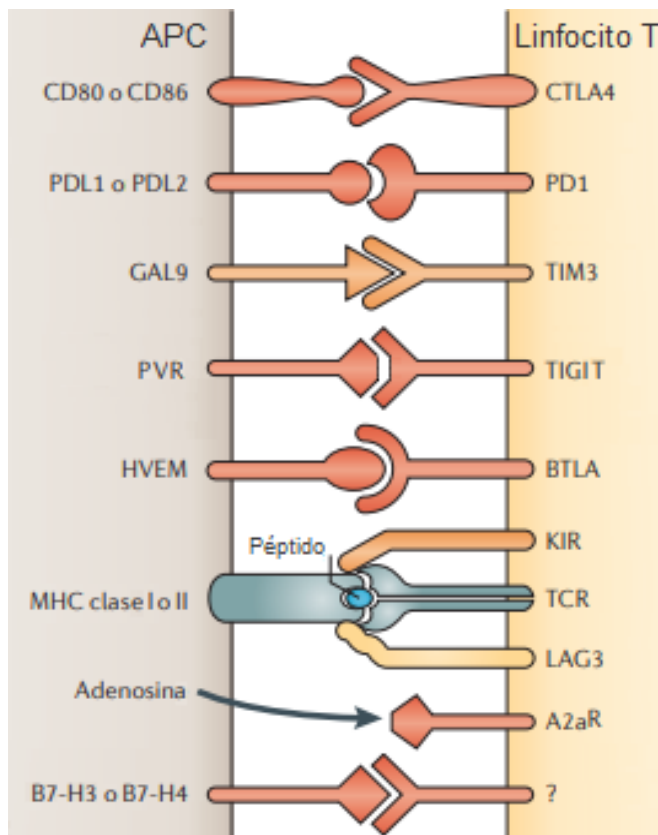


Figura 7. Principales interacciones co-inhibidoras que tienen lugar entre las APC y los linfocitos T (adaptada de Pardoll, 2012).

Otros puntos de control que se pueden bloquear son: BTLA-4, el receptor atenuador de linfocitos T y B, que se expresa sobre todo en linfocitos B, y se une a su ligando HVEM, el mediador de entrada del herpesvirus; VISTA, también conocido como el homólogo de PD-1 (PD-1H), expresado en leucocitos infiltrantes del tumor y sobreexpresado en linfocitos T reguladores y células supresoras de origen mieloide; ICOS, que juega un importante papel en la interacción linfocito T-APC y su unión al ligando ICOS-L suprime la formación de linfocitos T colaboradores de memoria asociados al tumor; y CD39, que se expresa tanto en células tumorales como en linfocitos T reguladores, promueve la proliferación tumoral porque inmunosuprime a los linfocitos infiltrantes del tumor.

1.3.6.2. Células supresoras de la respuesta inmune.

La inhibición de la respuesta inmune no solo se produce por la unión entre los receptores expresados en las superficies de los linfocitos T y las APC o las células tumorales, sino también porque las propias células tumorales pueden inducir el reclutamiento de diferentes conjuntos celulares capaces de inhibir la respuesta antitumoral a través de la liberación de citoquinas proinflamatorias. Aparte de las ya descritas en las secciones 1.3.1 y 1.3.2, las siguientes especies celulares también pueden inhibir la respuesta del SI contra el tumor:

- Linfocitos T reguladores

Son una subpoblación de linfocitos T CD4⁺ (aproximadamente el 5%) caracterizados por poseer moléculas de superficie CD25⁺, expresar el factor de transcripción intracelular Foxp3 y tener una baja expresión de CD127. Su función principal es mantener la homeostasis del SI

inhibiendo la respuesta de los linfocitos T una vez que el patógeno ha sido eliminado, pero también está implicado en enfermedades como el cáncer.

Existen diferentes tipos de linfocitos T reguladores en función del lugar donde se desarrollen: los linfocitos T reguladores derivados del timo (tTreg), también llamados nTreg (Frydrychowicz *et al.*, 2017) por su procedencia natural, que son aquellos responsables de la tolerancia periférica, y los linfocitos T reguladores inducidos (iTreg), que reemplazan a los primeros en condiciones patológicas como el cáncer y tienen funciones inmunosupresoras. En condiciones normales, los linfocitos Treg se producen en el timo a partir de las señales de activación generadas en el TCR de los linfocitos CD4⁺ tras la presentación de péptidos propios por el MHC de clase II de las APC. La alta estimulación del TCR genera la expresión de IL-2 (cuyo receptor es CD25) y Foxp3, el cual es el que produce la diferenciación hacia el linfocito T regulador (Togashi, Shitara y Nishikawa, 2019).

Los linfocitos Treg tiene las siguientes funciones inmunosupresoras (Plitas y Rudenksky, 2016):

- Producción de citoquinas inhibitorias como TGF- β , IL-10 o IL-35, que impiden la función de los linfocitos T efectores;
- Generan la citólisis de esos linfocitos T efectores a través de la producción de las granzimas y perforinas;
- Pueden generar adenosina extracelular que bloquea la activación de los linfocitos efectores;
- Entran en contacto directo con las células dendríticas a través de los receptores de co-inhibición LAG3 y TIGIT;
- Induce la generación deIDO sobre los linfocitos T efectores;

- Su receptor de membrana CTLA-4 inhibe el mecanismo de co-estimulación entre el receptor CD28 del linfocito T efector y los CD80 y CD86 de la APC.

Se han encontrado altos niveles de linfocitos Treg en la sangre periférica de pacientes con cáncer, como melanoma (Jacobs *et al.*, 2012) o cáncer de mama (Sánchez-Margalet *et al.*, 2019), que se han correlacionado con un peor pronóstico. Sin embargo, el papel de los linfocitos Treg necesita ser aclarado, porque parecen estar también involucrados en la disminución de la carga tumoral, lo que genera controversia sobre su función en el cáncer. De hecho, Frydrychowicz *et al.* (2017) explican que los linfocitos Treg pueden estar condicionados por la existencia de factores que podrían modular su función dentro del infiltrado tumoral, como factores ambientales, agentes infecciosos o productos derivados del tumor. Por ejemplo, en linfoma difuso de células grandes B, una alta cantidad de linfocitos Treg se ha correlacionado con un mejor (Tzankov *et al.*, 2008) o un peor pronóstico (Chang *et al.*, 2015).

- Linfocitos B reguladores

Los linfocitos B reguladores (Breg) son un subconjunto de linfocitos B inmunosupresores asociados a la inhibición de la inflamación a través de la secreción de IL-10. Existen varios subconjuntos de estas células, por lo que no presentan un fenotipo concreto, como los linfocitos Breg de la zona marginal, con fenotipo CD19^{hi}CD21^{hi}CD23^{hi} o CD19^{hi}CD5^{hi}CD1d^{hi}, encontrado en murinos. En humanos también existen diversos fenotipos de esta subpoblación de linfocitos B, como aquellas que se encuentran en estado inmaduro, con fenotipo CD19^{hi}CD24^{hi}CD38^{hi}, o las plasmablásticas, que son CD19^{hi}CD24^{hi}CD27^{int}.

Las funciones de los linfocitos Breg son diversas, aunque principalmente desarrollan su función a través de la secreción de IL-10. Con la liberación de esta citoquina son capaces de suprimir la inflamación, inducir la diferenciación de linfocitos T a reguladores y suprimir la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de las células dendríticas, por evitan la diferenciación de los linfocitos Th1 y Th17. Otras de las citoquinas que expresan estas células son TGF- β e IL-35. A través de TGF- β se induce la apoptosis de los linfocitos T CD4⁺ y la anergia de los CD8⁺, por lo que no reaccionan ante la presencia de un antígeno. La IL-35, entre otras funciones, también se encarga de la inducción de los linfocitos T a aquellos con un fenotipo regulador (Zhang, Gallastegui y Rosenblatt, 2015).

- Células supresoras de origen mieloide

Para proteger al individuo de los efectos perjudiciales que tiene la estimulación inmune excesiva durante las infecciones y para limitar la generación de respuestas autoinmunes hacia los antígenos se produce la estimulación de la médula ósea para que libere células mieloides inmaduras (IMC, del inglés *immature myeloid cells*), las cuales migran a los órganos periféricos, donde se diferencian rápidamente en granulocitos, macrófagos o células dendríticas en un proceso denominado mielopoyesis y que es controlado por diferentes citoquinas como GM-CSF, M-CSF, G-CSF, FLT3, SCF o IL-3. Sin embargo, en condiciones patológicas como las enfermedades autoinmunes, la infección o el cáncer se presenta un proceso de inflamación crónica asociado a la inmunosupresión. El proceso comienza con una alteración de la mielopoyesis, aumentando la proliferación y acumulación de IMC en el microentorno tumoral que forman en los órganos linfoides secundarios y los tejidos, previniendo su diferenciación e induciendo su activación, lo que le otorga una función inmunosupresora. Este conjunto comenzó a denominarse con

el nombre de células supresoras de origen mieloide (MDSC, del inglés *myeloid-derived suppressor cells*) con la finalidad de destacar su origen mieloide y sus propiedades inmunorreguladoras (Gabrilovich *et al.*, 2007). Las MDSC son, por tanto, una población heterogénea de IMC activadas que comprende macrófagos, células dendríticas y granulocitos en estado inmaduro.

Tipos de MDSC

La naturaleza de las MDSC se debe a los diversos marcadores que se encuentran en su superficie celular. Aunque históricamente los únicos marcadores conocidos eran Gr-1 y CD11b, basados en el fenotipo Gr-1⁺CD11b⁺ observado en ratones, con el descubrimiento de nuevas subpoblaciones mielocíticas inmaduras cambió el criterio empleado hasta el momento para fenotipar a esta población celular. En 2008, Movahedi *et al.* identificaron en ratones dos nuevas subpoblaciones de MDSC que presentaban diferentes funciones inmunosupresoras inhibiendo la actividad de los linfocitos T: aquellas derivadas de células mononucleares (Mo-MDSC) similares a los monocitos inflamatorios, con fenotipo CD11b⁺Ly6C⁺Ly6G⁻, y otras derivadas de granulocitos de baja densidad (PMN-MDSC), parecidas a los neutrófilos inmaduros y con fenotipo CD11b⁺Ly6C⁺Ly6G⁺. Actualmente, está establecido que los dos subconjuntos conocidos son las MDSC de precursores monocíticos (M-MDSC, antes nombradas Mo-MDSC), que comprenden macrófagos y células dendríticas y suponen aproximadamente el 20% de todas las MDSC, y las MDSC polimorfonucleares (PMN-MDSC), que representan un 80% del subconjunto de MDSC. Algunos autores difieren en la nomenclatura de este último subconjunto, ya que puede ser llamado como G-MDSC porque las consideran células inmaduras derivadas de precursores granulocíticos inactivados, mientras que otros autores lo denominan PMN-MDSC porque presenta características fenotípicas diferentes de los neutrófilos sin activar, como la reducción en la granulosidad y en los

niveles de CD16, así como el incremento de arginasa 1, peroxinitrito, VEGFR1, CD11b y CD66b (Rodríguez *et al.*, 2009).

En humanos, el fenotipo de las M-MDSC viene definido por CD11b·HLA-DR^{-low}·CD15⁻·CD14⁻ y el de las PMN-MDSC es CD11b·HLA-DR^{-low}·CD15⁺·CD14⁻ o CD11b·CD14⁻·CD66b⁻. Estas subpoblaciones se pueden cuantificar por citometría de flujo empleando el marcador CD33, ya que las M-MDSC expresan CD33⁻ mientras que las PMN-MDSC expresan CD33^{dim}. Sin embargo, el fenotipo Lin⁻ (un marcador de linaje celular inmaduro que incluye a los marcadores CD3, CD14, CD15, CD19, CD56) HLA-DR⁻·CD33⁻ lo forman grupos mixtos de MDSC que comprenden progenitores más inmaduros, pudiendo diferenciar, por tanto, entre los subconjuntos de células M-MDSC (CD11b·CD14⁻·CD15⁻) y PMN-MDSC (CD11b·CD14⁻·CD15⁺) (Bronte *et al.*, 2016). En este sentido, al compartir marcadores de linaje celular inmaduro, algunos autores engloban a ambos subconjuntos de células supresoras de origen mielóide en un grupo denominado como MDSC de etapa temprana (eMDSC, del inglés early-stage MDSC), nombre propuesto por Bronte *et al.* (2016).

Otro subconjunto está formado por las denominadas MDSC fibrocíticas (F-MDSC), diferenciadas a partir de precursores de células sanguíneas en cordón umbilical. Este grupo de MDSC se caracteriza por la expresión de marcadores asociados a fibrocitos, células dendríticas y otras MDSC. Las F-MDSC necesitan estar en contacto directo con los linfocitos T activados para ejercer sus funciones, entre las que destacan su capacidad para promover la expansión de linfocitos T reguladores o inducir la formación de normoglucemia en modelos de ratón xenogénico con diabetes tipo I, lo cual implica la posterior producción y liberación deIDO, con funciones inmunosupresoras. Fenotípicamente, las F-MDSC presentan similitudes con las ya mencionadas MDSC humanas, ya que comparten la expresión de altos

niveles de CD33, CD11b, CD14 o CD15, entre otras, y son positivas para IL-4R α . Sin embargo, no expresan NOS2 (sí lo hacen las PMN-MDSC) ni arginasa 1 o IL-13 (sí lo hacen las M-MDSC). Las F-MDSC también expresan marcadores empleados para identificar fibrocitos humanos, como CD163, CD45 o S100A8, y otros asociados con el fenotipo de los fibrocitos, como fibronectina, TLR4, IL-1 β o ICAM1. Se diferencia de los fibrocitos en que expresan niveles bajos o nulos de marcadores como α -SMA, CCR7 o colágeno VI (Zoso *et al.*, 2014).

Goldmann, Beineke y Medina (2017) identificaron una nueva subpoblación de MDSC fenotípicamente similar a los eosinófilos (Eo-MDSC) en ratones infectados con *S. aureus*. Este nuevo conjunto de MDSC ejerció un fuerte efecto inmunosupresor en la respuesta de los linfocitos T tras realizar una transferencia adoptiva de estas células en los ratones. Las Eo-MDSC expresan grandes cantidades de CD11b y Syglec-F (marcadores típicos de eosinófilos), niveles variables de CCR3 y una baja cantidad de IL-5R α . Los autores del estudio encontraron que durante la progresión de *S. aureus*, las Eo-MDSC se expandían de una forma parecida a como lo hicieron los subconjuntos PMN-MDSC y M-MDSC.

Funciones de las MDSC

Las MDSC se caracterizan por la inhibición en la proliferación, diferenciación y activación de los linfocitos T, por lo que no permiten la respuesta inmune contra el tumor. En general, el rol principal de las MDSC es inmunosupresor, como se muestra en la Figura 8, ya que su finalidad es que las células tumorales escapen del SI y puedan llegar a producir metástasis. Lo hacen a través de varios mecanismos:

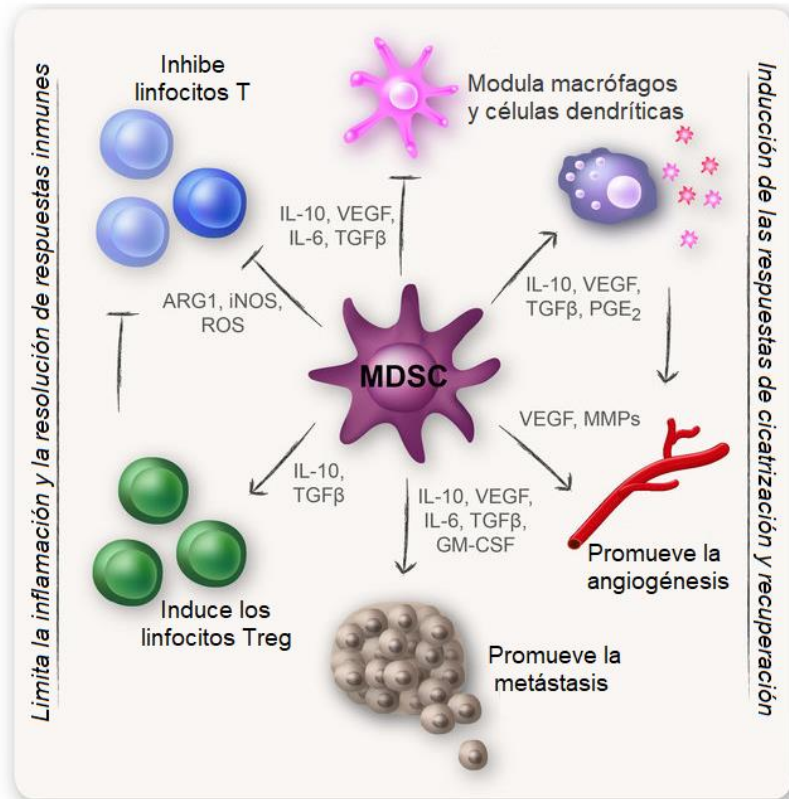


Figura 8. Mecanismos de progresión tumoral de las MDSC (adaptado de Millrud, Bergenfelz y Leandersson, 2017).

- Las MDSC pueden inhibir la maduración y la función de los linfocitos NK en el SII por medio de la liberación de TGF- β y, a través de la secreción de IL-10, inhiben algunas funciones inflamatorias de los macrófagos activados y las células dendríticas e inducen el fenotipo M2 de los macrófagos, que favorece el desarrollo tumoral.
- Las MDSC causan la disminución de los aminoácidos L-arginina y L-cisteína, que son esenciales para la proliferación y diferenciación de los linfocitos T. Por un lado, la L-arginina es consumida por la arginasa 1, que es inducida en el citosol de las MDSC a través de IL-4 o IL-13, inhibiendo la función de la cadena Z del TCR y permitiendo

que los linfocitos T entren en el ciclo G0-G1 del ciclo celular, lo que impide su proliferación y posterior diferenciación. Por otro lado, la L-cisteína necesaria para la proliferación y diferenciación de los linfocitos T puede ser producida de dos formas: 1) A través de un transporte de membrana de la forma oxidada de la cistina, de cuya proteína de transporte carecen los linfocitos T, por lo que siempre la obtienen a través de las APC en la presentación antigénica y 2) a través de L-cistina extracelular, que es convertida a L-cisteína y degradada en el citosol de las MDSC, por lo que se reduce su disponibilidad para los linfocitos T.

- Las MDSC expresan diferentes enzimas como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) para producir óxido de nitrógeno (NO) y NADPH oxidasa 2 (NOX2) para producir especies reactivas de oxígeno (ROS), como peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y peroxinitrito (ONOO⁻). El H₂O₂ causa la pérdida de la cadena Z del TCR y el peroxinitrito es un radical libre que causa la nitración y la nitrosilación de quimiocinas como CCL2 y componentes del complejo que conforma el TCR, inhibiendo el reclutamiento y la activación de los linfocitos T.
- Las MDSC inducen el desarrollo de linfocitos T reguladores, proceso mediado por la interacción de su TCR con el MHC de clase II y la unión de CD40 con su ligando CD40L (esencial para la activación de los linfocitos Treg). Además, la secreción de factores como IL-10, TGF- β y la disminución de L-arginina también contribuyen a ello. Aunque hay otras consideraciones al respecto, ya que Movahedi et al. (2008) sugirieron que las MDSC no estaban implicadas en la expansión de los linfocitos T reguladores al observar que un porcentaje de las Treg permanece invariable durante el crecimiento tumoral y no se relaciona de ninguna forma con la expansión de las MDSC.

- Las MDSC promueven la angiogénesis, creando nuevos vasos sanguíneos a través de los cuales las células tumorales pueden expandirse.

La actividad inmunosupresora de las MDSC descrita en los puntos anteriores requiere previamente su proliferación y activación en el microambiente tumoral a través de diferentes factores. Por un lado, la proliferación de este conjunto celular está mediada a través de diversas citoquinas liberadas por las propias células tumorales o aquellas estromales que están asociadas al tumor, entre las que se encuentran GM-CSF, G-CSF, M-CSF, SCF, VEGF, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IFN- γ y PROK2. Estas citoquinas, aparte de las que son liberadas en otras situaciones patológicas como la infección (dsRNA, IFN- γ , CpG DNA, flagelina, C5a, S100A8, S100A9, GM-CSF, LPS, HSP) y el trauma (IL-1 β , GM-CSF, IFN- γ , HSP, C5a, S100A8, S100A9), promueven la expansión de las MDSC e inhiben su diferenciación en células mieloides maduras. En la activación, en cambio, las citoquinas son producidas por los linfocitos T activados y las células del estroma tumoral, como IFN- γ , TLR, IL-3, IL-14 o TGF- β .

Papel de las MDSC en diferentes enfermedades

El rol que han demostrado tener las MDSC durante estos últimos años en la inmunomodulación ha supuesto que este subconjunto celular sea estudiado en diversas enfermedades. En algunos casos desempeñan una función dual en el SI (Budhwar *et al.*, 2018); por ejemplo, en modelos experimentales de sepsis se ha observado que las MDSC son beneficiosas a corto plazo porque limitan la inflamación excesiva en las primeras etapas de la enfermedad, mientras que a largo plazo han demostrado ser perjudiciales debido a su efecto inmunosupresor. En la mayoría de los estudios clínicos realizados, se han correlacionado altos niveles de MDSC en sangre con un

empeoramiento clínico de los pacientes, ya sea asociado al desarrollo de la enfermedad, a la muerte o a las infecciones secundarias derivadas, mientras que en pacientes sanos el nivel de MDSC encontrado ha sido muy bajo, por lo que las MDSC se pueden considerar un buen biomarcador y un objetivo terapéutico para esta enfermedad (Schrijver, Thérouté y Roger, 2019). Además, las PMN-MDSC parecen estar implicadas en la aparición de infecciones nosocomiales en pacientes (Uhel *et al.*, 2017).

También se han considerado las MDSC en la aceptación de trasplante de órganos como terapia celular: las células dendríticas, los macrófagos o los neutrófilos contribuyen al rechazo del trasplante y, sin embargo, las MDSC deberían prevenir la inmunogenicidad y aportar información crítica sobre el estado inmune de los receptores de trasplantes de órganos, aunque hay varias dificultades para poderlo llevar a cabo con fiabilidad, ya que es necesario identificar y caracterizar el perfil de MDSC en los receptores de trasplantes (Ochando *et al.*, 2019). En la inmunosenescencia producida por el envejecimiento se han encontrado niveles elevados de MDSC (principalmente de PMN-MDSC); aparte, se ha relacionado su cooperación con otras células inmunosupresoras, como los linfocitos T reguladores, cuyos niveles también se encuentran elevados, en la inhibición de las funciones inmunes en condiciones inflamatorias. A pesar de esto, la relación directa existente entre la inmunosenescencia y el papel de células inmunosupresoras aún necesita ser aclarado con futuros estudios, ya que aunque se cree que las MDSC podrían coordinar la inmunosenescencia y en muchos estudios se concluye una disminución de las funciones del SI, resulta difícil determinar si los efectos generales son perjudiciales o no, puesto que la inmunosenescencia parece ser un mecanismo de remodelación y mantenimiento de la homeostasis a medida que envejecemos (Salminen, Kaarniranta y Kauppinen, 2019). En enfermedades autoinmunes hay ciertos aspectos que requieren de

mayor investigación: principalmente, es necesario entender por qué los mecanismos de inmunosupresión de las MDSC son diferentes en los experimentos obtenidos *in vitro* e *in vivo*, ya que en los primeros se observa una gran inhibición de las funciones de los linfocitos T debido a las MDSC y en los segundos la presencia de las MDSC en el microentorno genera controversia, ya que su papel no está del todo claro (Ma y Xia, 2018).

El papel de las MDSC en cáncer parece definido. Así, en cáncer de páncreas hay factores emergentes que podrían estar implicados tanto en el reclutamiento como en el aumento de MDSC y linfocitos T reguladores, como el pH del estroma y nutrientes como la glucosa o el metabolismo de los lípidos, que pueden aumentar el riesgo de padecer la enfermedad y favorecer el crecimiento y la progresión del tumor. Además, la acumulación en el microentorno tumoral de lactato y la captación de ácidos grasos también se asocian a una mayor expansión de MDSC (Padoan, Plebani y Basso, 2019). En cáncer de próstata se ha observado la acumulación en sangre periférica de MDSC (especialmente de M-MDSC), que inhiben la proliferación de linfocitos T CD8, mientras que en personas sanas el nivel de MDSC es bajo, lo que hace pensar en las MDSC como un objetivo terapéutico en este tipo de cáncer (Fujita *et al.*, 2019). En una revisión llevada a cabo Lu, Chang y Hsu (2019) se refleja de nuevo el papel inmunosupresor de las MDSC en cáncer hepatocelular tanto en modelos preclínicos como en ensayos fase I, II y III, en los que hay disminución de MDSC y mejora clínica de los pacientes tras tratamiento con inhibidores de *checkpoints*, entre otros. En cáncer de mama también se ha demostrado que se produce un reclutamiento y proliferación de MDSC en el microambiente tumoral, no solo para suprimir la respuesta inmune de los linfocitos T, sino para contribuir al desarrollo de la metástasis a través de la estimulación de la fosforilación de STAT3 y para producir osteólisis (Shou *et al.*, 2016). Otros ejemplos se encuentran en el cáncer

colorrectal (Karakasheva *et al.*, 2018), renal (Guan *et al.*, 2018), de ovario (Horikawa *et al.*, 2017), melanoma (Blattner *et al.*, 2018) o linfoma difuso de células grandes B (Wu *et al.*, 2015), donde también se ha observado la acumulación de MDSC en el microentorno tumoral y se ha correlacionado con un peor pronóstico de la enfermedad. Por tanto, es claro el papel inmunosupresor de las MDSC en cáncer con la finalidad de provocar la evasión y proliferación tumoral.

Además, Kumar *et al.* (2016) y Safarzadeh *et al.* (2018) recogen en sus revisiones el tipo de MDSC (PMN-MDSC, M-MDSC o ambos conjuntos) que se pueden reclutar o expandir en diferentes tipos de cáncer en función de las citoquinas liberadas en el microentorno tumoral.

Terapias dirigidas a las MDSC

La importancia que han ido adquiriendo en los últimos años las MDSC por su papel en la supresión inmune y la progresión tumoral ha provocado un cambio en el enfoque de la inmunoterapia del cáncer. Por ello, en los últimos tiempos se han buscado diferentes opciones inmunoterápicas centradas en las MDSC. En la revisión de Anani y Shurin (2017) se explican con detalle las siguientes alternativas:

- Inmunoterapias enfocadas a la inhibición del desarrollo y expansión de MDSC: se ha conseguido reducir el desarrollo de MDSC en la médula ósea tanto en ratones como en humanos a través de agentes bloqueantes del factor SCF, VEGF y la inhibición de las vías de señalización JAK2-STAT3.
- Inmunoterapias enfocadas al reclutamiento y la migración de MDSC: a través del uso de tratamientos como anti-IL-6, que ha mejorado la función de los linfocitos T, o anti-metaloproteinasa-9, que junto con vacunas de plásmidos han logrado potenciar el

efecto inmunoterápico, se ha logrado reducir el reclutamiento de MDSC en el microambiente tumoral.

- Inmunoterapias enfocadas a la inhibición de las funciones de MDSC: se han desarrollado nitroaspirinas, que suprimen la formación de ROS e iNOS y potencia la proliferación y la función antitumoral de los linfocitos T, o fármacos inhibidores de prostaglandinas, como anti-COX-2, que ha disminuido el nivel de MDSC en ratones.
1. Inmunoterapias enfocadas en la diferenciación de las MDSC: está demostrado que la vitamina A y D pueden inducir la diferenciación de las MDSC a células mieloides maduras, que no presentan funciones inmunosupresoras y son las que se encuentran en individuos sanos. Por ejemplo, se ha observado que en ratones y humanos con cáncer de pulmón sin operar hay déficit de vitamina A. Además, el metabolismo de esta vitamina produce ácido trans-retinoico, que induce la diferenciación de MDSC en otras maduras. Por otro lado, los tratamientos con vitamina D inducen la proliferación de células dendríticas maduras y se observan menos IMC. También se han probado terapias con IL-12 en ratones con cáncer de pulmón, lo cual disminuyó la carga tumoral y la cantidad de NO.
- Inmunoterapia enfocada en la eliminación de las MDSC: se han probado agentes citotóxicos, como gemcitabina, cisplatino o 5-fluorouracilo, que han demostrado inducir la muerte celular de las MDSC y la apoptosis de las células tumorales. También se ha observado una disminución de las PMN-MDSC en ratones, sin variar los niveles linfocitarios, por el uso de gemcitabina, lo cual se traduce en una mejora de la producción de IFN- γ por los linfocitos T CD8, de forma que se eleva la actividad antitumoral.

Otros fármacos probados han sido anti-IL-13, que en ratones ha mostrado mejores resultados en combinación con vacunas, o los bloqueadores de histamina, que pueden inhibir el crecimiento tumoral a través de la apoptosis de las MDSC, aunque el mecanismo exacto de acción se desconoce aún.

2. Linfoma difuso de células B grandes

2.1. Definición.

El linfoma difuso de células grandes B (DLBCL, del inglés *Diffuse large B cell lymphoma*) es el subtipo histológico más común de linfoma no Hodgkin, ya que representa entre el 30 y el 40% de todos los casos de linfoma no Hodgkin diagnosticados en todo el mundo, tal como se muestra en la Figura 9.

Afecta principalmente a personas de avanzada edad, aunque también puede ocurrir en adultos jóvenes y raramente en niños, siendo ligeramente predominante en hombres (Li, Young, y Medeiros 2018). Recibe ese nombre porque se produce a partir de linfocitos B de un mayor tamaño comparados con los sanos y sigue un patrón difuso de invasión de los ganglios linfáticos. Es un linfoma de crecimiento rápido, con una elevada tasa de proliferación celular y un comportamiento agresivo. Al igual que el resto de los linfomas, las vías de diseminación del DLBCL se pueden dar tanto por contigüidad, invadiendo los órganos y tejidos adyacentes según crece el tumor, como por localizaciones ganglionares vecinas, a través de los conductos linfáticos. Además, como los linfocitos tumorales pueden circular por la sangre se pueden asentar nuevos focos del linfoma en cualquier órgano a distancia o afectar difusamente a la médula ósea.

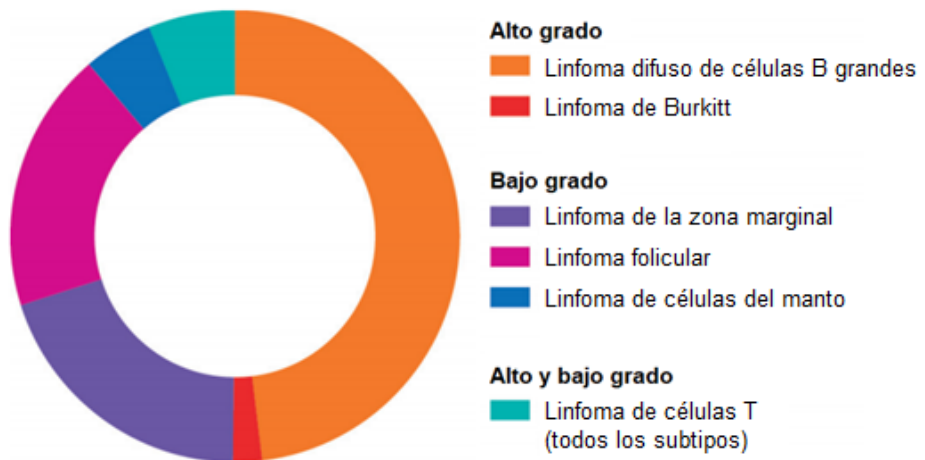


Figura 9. Tipos de linfoma no Hodgkin. El DLBCL es el más común, ya que debido a su heterogeneidad clínica y biológica representa aproximadamente un 40% (imagen adaptada de Bowzyk Al-Naeab et al., 2018).

2.2. Incidencia.

A nivel global, únicamente en los Estados Unidos el DLBCL es más común que en Europa. En 2016 se diagnosticaron casi 28.000 casos de esta enfermedad en ese país (Teras et al. 2016), esto quiere decir que se dio una incidencia de aproximadamente 9 casos por 100.000 habitantes, mientras que en Europa la incidencia media baja a 3 o 4 casos por cada 100.000 habitantes (Tilly et al. 2012). Más concretamente, en España, Solans *et al.* (2019) predijeron que los casos de DLBCL diagnosticados en el año 2020 serían aproximadamente 3.000, lo que supondría una incidencia de unos 6 casos por cada 100.000 habitantes.

Actualmente, de todos los pacientes que son diagnosticados de DLBCL, únicamente son entre el 60 y el 70% los que consiguen estar libres de la enfermedad empleando el tratamiento estándar, que incluye

rituximab, a los 4 años del diagnóstico. Sin embargo, aproximadamente un tercio de los pacientes son refractarios al tratamiento inicial porque no responden a él o sufren recaídas tras recibir la terapia estándar (Friedberg 2011). Por ello, para este grupo de pacientes se han desarrollado diferentes estrategias con nuevos fármacos o combinaciones de éstos (Marangon et al. 2019; Van Dijck et al. 2017; Crump et al. 2017).

2.3. Clasificación.

La Organización Mundial de la Salud estableció en 2008 la cuarta edición de la clasificación de tumores linfoides y hematopoyéticos, mejorando la anterior edición, de 2001, definiendo nuevas entidades y categorizando de nuevo algunas enfermedades ya incluidas. Uno de los cambios con respecto a la tercera edición fue considerar al DLBCL como una entidad independiente de las demás debido a su heterogeneidad clínica y biológica (Campo et al. 2011). Más tarde, se publicó una revisión actualizada de la cuarta versión, que incluía únicamente una pequeña cantidad de entidades provisionales nuevas (Swerdlow et al. 2016). En la Tabla 1 se distinguen los tipos de DLBCL y las entidades relacionadas con esta enfermedad, principalmente asociadas a las características moleculares de esta neoplasia, tal como se recoge en la clasificación del año 2016 de la Organización Mundial de la Salud.

En los siguientes apartados se detallará cada sección de la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (2016) de subtipos de DLBCL y entidades relacionadas (adaptada de Li, Young y Medeiros, 2018).

<p>DLBCL-NOS</p> <ul style="list-style-type: none"> - GCB vs. ABC/no GCB - Doble expresión: MYC y BCL2 - CD5 positivo
<p>Subtipos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Linfoma de células B grandes rico en histiocitos y linfocitos T - DLBCL primario del sistema nervioso central - DLBCL primario cutáneo - DLBCL EBV positivo
<p>Otros linfomas de células B grandes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Linfoma de células B grandes mediastínico - Linfoma de células B grandes intravascular - DLBCL asociado a inflamación crónica - Granulomatosis linfomatoide - Linfoma de células B grandes ALK positivo - Linfoma plasmoblástico - DLBCL HHV8 positivo - Linfoma de efusión primaria
<p>Casos intermedios</p> <ul style="list-style-type: none"> - Linfoma de células B de alto grado, con MYC, BCL2 y/o traslocaciones de BCL6 - Linfoma de células B de alto grado-NOS - Linfoma de células B con características intermedias entre DLBCL y linfoma de Hodgkin clásico

2.3.1. DLBCL no especificados en otras categorías

Ya en la clasificación de 2008 se empezaron a distinguir algunas variantes que por ser biológicamente heterogéneas no podían ser incluidas en ningún otro grupo de DLBCL, de ahí que la OMS las recogiera dentro de un grupo conocido como NOS (del inglés *not otherwise specified*). En esta enfermedad, los linfocitos B malignos infiltran de manera difusa los ganglios linfáticos o sitios extranodales. Los perfiles de expresión génica (GEP, del inglés *gene expression profile*) de los DLBCL permitieron la identificación de dos subtipos según su célula de origen: el DLBCL de fenotipo centro germinal (GCB, del inglés *germinal center B-cell like*) y el DLBCL de células B activadas (ABC, del inglés *activated B-cell-like*), a veces llamado como no GCB (Caimi et al. 2016) por la posible existencia de otras variantes diferentes al GCB. Ambos subgrupos difieren tanto en sus alteraciones cromosómicas, como en la activación de las vías de señalización y los resultados clínicos (Swerdlow et al. 2016).

Los DLBCL con expresión de MYC y BCL2 son de pobre pronóstico. El oncogén MYC se encuentra sobreexpresado aproximadamente en el 10% de los DLBCL e indica un avance agresivo de la enfermedad (W. G. Wang et al. 2017). El gen BCL2 es uno de los marcadores moleculares más estudiados porque se encuentra aproximadamente en la mitad de los casos de DLBCL; es un factor antiapoptótico muy importante en el desarrollo y diferenciación de los linfocitos B y su mecanismo de sobreexpresión se limita al subtipo GCB a través de una anomalía cromosómica concreta, la translocación t(14;18), mientras que en el subtipo ABC la sobreexpresión de este marcador molecular está asociada a la activación de la vía NF-κB (Iqbal et al. 2011).

El DLBCL CD5⁺ representa entre el 5 y el 10% de todos los casos de la enfermedad; presenta características clínico-patológicas características que suelen ocurrir en sitios extranodales, con afectación al sistema nervioso central y comportamiento agresivo (Thakral et al. 2017). Suele manifestarse en personas de avanzada edad, sobre todo en la población femenina. Los GEP han permitido correlacionar la mayoría de este tipo de DLBCL con el subgrupo ABC, de peor pronóstico (Jain et al. 2013).

Aunque en la clasificación de 2016 no aparece, en la de 2008 el grupo DLBCL-NOS también recogía otros subtipos clasificados según sus características morfológicas: centroblásticos, inmunoblásticos y anaplásicos. Los DLBCL de tipo centroblástico representan aproximadamente el 80% de todos los casos de la enfermedad, los de tipo inmunoblástico entre el 8 y el 10%, y los anaplásicos menos del 5% de los casos (Li, Young, y Medeiros 2018). Aunque los GEP han mostrado una correlación de los centroblásticos con el tipo GCB y de los inmunoblásticos con el tipo ABC (Y. Xie, Pittaluga, y Jaffe 2015), también se ha demostrado lo contrario: en un estudio de Ott *et al.* (2010) se obtuvo un 7,4% de casos clasificados como inmunoblásticos y ABC, cantidad bastante inferior a lo esperado a través de los GEP. Esta diferencia de resultados explica la dificultad de seguir un criterio estricto para identificar, clasificar y correlacionar los diferentes tipos de DLBCL.

2.3.2. Otros subtipos de DLBCL.

El linfoma de células B grandes rico en histiocitos y linfocitos T es una variante morfológica poco común del DLBCL (entre el 1 y el 3%); se observa mayoritariamente en hombres de mediana edad con afectación hepática, en médula ósea o bazo (Zheng et al. 2017). El DLBCL primario del sistema nervioso central representa menos del 1%

de todos los linfomas no Hodgkin y suele ocurrir en hombres de avanzada edad. Además, no se ha encontrado correlación con el tipo GCB y suele presentar la translocación del gen BCL6 (Perry, Mitrovic, y Chan 2012), frecuentemente detectada en un tercio de los pacientes y en otras variantes de la enfermedad. El DLBCL primario cutáneo pertenece al grupo de los linfomas cutáneos primarios de células B, que suelen ocurrir en las piernas. Suele ser un linfoma extraño en cuanto a características clínicas, por lo que puede dar lugar a un diagnóstico erróneo (Jia, Li, y Zheng 2017). El DLBCL de EVB⁺ se basa en una proliferación de linfocitos B clonales con virus de Epstein-Barr positivo que suele aparecer en personas mayores de 50 años y sin antecedentes de linfoma. Se cree que está relacionado con la inmunosenescencia y se asocia a un DLBCL de tipo ABC (Y. Xie, Pittaluga, y Jaffe 2015).

2.3.3. Otros linfomas de células B grandes.

El linfoma mediastínico de células B grandes supone menos del 10% de todos los casos de DLBCL y presenta características biológicas y clínicas diferentes de otros tipos de DLBCL. Suele estar asociado a la esclerosis y aparece frecuentemente en mujeres jóvenes (Martelli et al. 2017). El linfoma intravascular de células B grandes es una variante del DLBCL menos frecuente aún, ya que la incidencia es de menos de uno por millón; existen dos variantes: una hemofagocítica con insuficiencia multiorgánica y otra caracterizada por síntomas relacionados con el órgano involucrado (Devitt y Gardner 2018). El LDCGB asociado a inflamación crónica suele aparecer en cavidades corporales o espacios estrechos, como la cavidad pleural, los huesos o las articulaciones; existe una latencia del virus de Epstein-Barr (EBV) y la sobreexpresión de marcadores de linfocitos T (Y. Xie, Pittaluga, y Jaffe 2015). La granulomatosis linfomatoide está asociada al EBV; se trata de un

linfoma extraganglionar caracterizado por su angiocentricidad, presenta poca incidencia y afecta más a los hombres de mediana edad (Gutiérrez-Domingo, Gutiérrez-Domingo, y Gallardo-Rodríguez, 2018). El linfoma ALK⁺ es un linfoma agresivo que se caracteriza por reordenamientos de la quinasa del linfoma anaplásico, receptor de la tirosina quinasa que pertenece a la familia de los receptores de insulina. Representa menos del 1% de los DLBCL, ya que conocen únicamente unos 100 casos desde la primera vez que fue descrito, en el año 1.997 (Pan et al. 2017). El linfoma plasmoblástico se caracteriza por el aumento de los niveles de plasmablastos en la sangre y los ganglios linfáticos debido al diagnóstico positivo del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y EBV; es predominante en hombres y suele aparecer en la cavidad oral, aunque también puede ocurrir en el tracto gastrointestinal, los huesos, la médula ósea o la piel (Mohd et al., 2019). El DLBCL positivo para el herpesvirus humano 8 (HHV-8) es una enfermedad que en la mayoría de los casos surge junto con la enfermedad de Castleman multicéntrica y con la infección por VIH, y suelen ser negativos para el EBV; los casos suelen ser extremadamente agresivos (Grimm y O'Malley 2019). El DLBCL de efusión primaria es un subtipo asociado al HHV-8; suele ocurrir en hombres jóvenes o de mediana edad que presentan una infección por VIH, aunque también puede aparecer en personas de avanzada edad (Y. Xie, Pittaluga, y Jaffe 2015).

2.3.4. Linfomas de células B con características intermedias entre DLBCL y otras neoplasias linfoides.

El linfoma de células B con alta expresión de MYC y BCL2 con translocaciones de BCL6 es una entidad poco común, pero con un comportamiento clínico agresivo; la sobreexpresión de P53 supone un factor de pobre pronóstico (Huang et al. 2018). El linfoma de células B

de alto grado-NOS se caracteriza por presentar características compartidas entre el DLBCL y el linfoma de Burkitt ya que, a pesar de que el GEP del linfoma de Burkitt es característico para esta enfermedad, hay casos que morfológicamente están dentro del espectro del DLBCL con un GEP similar; presenta un comportamiento agresivo y se observa principalmente en adultos con enfermedad ganglionar y extraganglionar generalizada junto con manifestaciones leucémicas en algunos pacientes; en la clasificación del año 2008 de la Organización Mundial de la Salud era denominado como linfoma B con características intermedias entre DLBCL y linfoma de Burkitt (Campo et al. 2011).

También existen variantes de DLBCL con características clínicas, morfológicas e inmunofenóticas similares entre el linfoma de células B mediastínico y el linfoma de Hodgkin; este subtipo predomina en hombres jóvenes y está compuesto por células tumorales que morfológicamente tienen una apariencia similar a las células de Hodgkin y otras áreas son parecidas a las del linfoma de células B mediastínico; el pronóstico es más pobre que el de ambas enfermedades por separado (Grimm y O'Malley 2019).

2.4. Factores pronósticos.

Actualmente, los tratamientos de primera línea para el DLBCL funcionan aproximadamente en el 60% de los pacientes. Esto, unido a la dificultad de desarrollar estrategias para la clasificación y el pronóstico de la enfermedad debido a su heterogeneidad, hace necesaria la identificación de nuevos biomarcadores o factores pronósticos. Se han intentado desarrollar categorías de DLBCL atendiendo a factores como el Índice de Pronóstico Internacional (IPI,

del inglés *International Prognostic Index*), los GPE de los subtipos GCB y ABC/no GCB, la inmunohistoquímica de la enfermedad, entre otros.

2.4.1. Índice de Pronóstico Internacional

El IPI, que fue desarrollado en 1993 por el Proyecto Internacional de Factores Pronósticos para Linfoma no Hodgkin, era una clasificación que dividía a los pacientes en cuatro grupos de riesgo: bajo, bajo-intermedio, intermedio-alto y alto. Esto lo hacía atendiendo a los factores pronósticos que se muestran en la Tabla 2: edad, estadio de la enfermedad según la clasificación de Ann Arbor, nivel de deshidrogenasa láctica, estado clínico general y la aparición de sitios extranodales. Años más tarde se reevaluó el IPI y se redistribuyeron los factores en una versión revisada (R-IPI) porque Sehn *et al.* (2007) observaron que la curva de supervivencia libre de progresión y la de supervivencia global se superponían en los dos grupos de mayor riesgo (intermedio-alto y alto) y, de la misma manera, en los dos grupos de bajo riesgo (bajo e intermedio-bajo). Actualmente, en el R-IPI existen tres grupos de riesgo claramente diferenciados, en vez de cuatro grupos superpuestos dos a dos: muy buen pronóstico (0 puntos), buen pronóstico (1-2 puntos) y mal pronóstico (≥ 3). Además, debido a la cantidad de factores pronósticos negativos que actualmente hay que controlar en el diagnóstico de un paciente, el R-IPI se hace necesario para guiar la planificación del tratamiento empleado y la interpretación de los ensayos clínicos de forma correcta.

Además del IPI y del R-IPI, en el DLBCL existen otros factores pronósticos para clasificar a los pacientes por grupo de riesgo, aunque no ayudan a la elección de un tratamiento u otro puesto que no muestran las características biológicas del tumor. Estos factores son: tener un tamaño tumoral máximo mayor de 10

cm, ser de sexo masculino y presentar una elevación en los niveles séricos de Ig de cadenas ligeras, características fácilmente detectables en la práctica clínica diaria (Sehn, 2012).

Tabla 2. Índice de Pronóstico Internacional para linfomas no Hodgkin y puntuación según el grupo de riesgo. En negrita se muestran los factores de peor pronóstico.

Edad	< 60 años vs. ≥ 60 años
Estadio Ann Arbor	I-II vs. III-IV
Nº zonas extra ganglioranes	0-1 vs. ≥ 2
Estado general (ECOG)	0-1 vs. ≥ 2
Deshidrogenasa láctica	Normal vs. anormal
En el IPI existen 4 grupos de riesgo, con puntuación de 0 a 5:	
<ul style="list-style-type: none"> - Puntuación 0-1: bajo riesgo - Puntuación 2: riesgo bajo/intermedio - Puntuación 3: riesgo intermedio/alto - Puntuación 4-5: alto riesgo 	

2.4.2. Perfiles de expresión génica

Alizadeh *et al.* (2000) utilizaron por primera vez los GEP en DLBCL dividiendo a los pacientes en tres grupos, que eran mayoritariamente las variantes GCB y ABC, además de pequeños subtipos que no se podían clasificar en los dos anteriores. El subtipo GCB suele estar relacionado con una mayor supervivencia global de la enfermedad, mientras que el subtipo ABC expresa genes relacionados con la vía NF-κB y la supervivencia global es menor (Li, Young, y Medeiros 2018).

El GEP presenta algunas ventajas, por ejemplo, al agrupar a los pacientes en dos subtipos diferentes de DLBCL éstos se pueden ver beneficiados por el uso de tratamientos específicos y también aporta información sobre los mecanismos moleculares derivados de la enfermedad, aunque aún se necesitan más pruebas y estrategias de tratamiento para que la información que aporta el GEP se pueda emplear de forma efectiva (Carbone et al. 2014).

2.4.3. Métodos inmunohistoquímicos

Se basan en algoritmos que surgieron como sustitutos de la información pronóstica que aporta el GEP. Actualmente, el más empleado por su simplicidad y por ser un método que presenta una alta coincidencia con los resultados obtenidos a través del GEP es el logaritmo de Hans, que divide a los pacientes en GCB y no GCB en función de la presencia de los marcadores CD10, BCL6 e IRF4/MUM1, como se observa en la Figura 10.

Meyer *et al.* (2011) compararon varios métodos inmunohistoquímicos (algoritmos de Hans, Choi, Muris, Nyman, Natkuman y Tally) y determinaron que, según lo establecido a través de los GEP, el algoritmo de Tally era el mejor para predecir el subtipo de DLBCL, aunque presentaba algunos inconvenientes que dificultaban su uso rutinario y que no tenían los algoritmos de Hans o Choi. También observaron que el mejor para determinar la supervivencia global era el algoritmo de Muris.

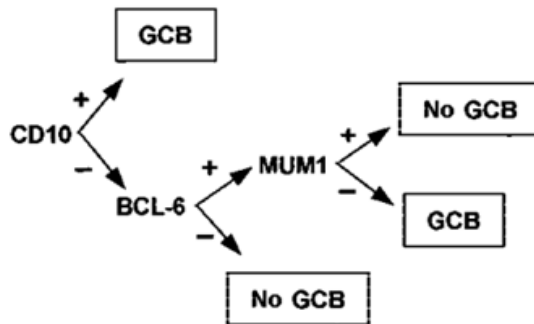


Figura 10. Esquema del algoritmo de Hans. Es el método inmunohistoquímico más empleado actualmente para determinar el subtipo de DLBCL (adaptada de Hans et al., 2004).

2.4.4. Métodos moleculares

Se ha detectado la existencia de algunos factores transcripcionales que son de mal pronóstico en el DLBCL: por ejemplo, la sobreexpresión de MYC se ha correlacionado con la señalización del BCR en DLBCL y se ha demostrado que la inhibición o sobreexpresión del gen puede inhibir o aumentar la señalización del BCR, por lo que MYC podría ser un potencial predictor de respuesta a los inhibidores de señalización de BCR (W. G. Wang et al. 2017). También se ha observado que la sobreexpresión del gen BCL2 tenía un pronóstico negativo antes del uso de rituximab, pero mejoró tras el uso del fármaco en combinación con quimioterapia estándar, especialmente en aquellos pacientes con DLBCL de tipo ABC (Vaidya y Witzig 2014).

Entre los métodos moleculares como factor pronóstico también se incluyen los linfomas doble y triple hit. La proliferación celular asociada a la proteína MYC se correlaciona con mal pronóstico, ya sea con la sobreexpresión de BCL2 o BCL6. En el subtipo GCB con expresión CD10⁺BCL6⁺MUM1⁻ la proteína BCL2 aparece en el 95% de los casos (Aukema et al. 2011). También hay linfomas triple hit que se

presentan como una relación entre MYC, BCL2 y BCL6 (Huang et al. 2018).

2.4.5. MicroRNA

En una revisión llevada a cabo por López-Santillán et al. (2018) se hace un análisis en profundidad de los diferentes tipos de microRNA (miRNA) circulantes que pueden servir como factor pronóstico en DLBCL, aunque la falta de estudios y la inconsistencia en algunos resultados dificultó sacar conclusiones. Algunos de los miRNA estudiados han sido miR-15a, miR-21 y miR-155, que aumentan su expresión de forma significativa en pacientes con la enfermedad, o miR-29c, miR-34a y miR-145, cuya expresión disminuye; sin embargo, Khare et al. (2017) encontraron que en la expresión de miR-15a, miR-21 o miR-34a no había diferencias significativas tras comparar con una cohorte sana. López-Santillán et al. también clasificaron los miRNA en función del IPI y del subtipo GCB/ABC, aunque no se obtuvieron resultados concluyentes.

2.4.6. Vitamina D

Parece demostrado que la vitamina D tiene efectos sobre la diferenciación celular, la proliferación, la angiogénesis y la apoptosis (Hosseini-nezhad y Holick, 2013). En un estudio llevado a cabo por Drake *et al.* (2010) se observó el efecto de la vitamina D sobre la supervivencia global en 983 pacientes recién diagnosticados con diferentes tipos de linfoma no Hodgkin, entre ellos el DLBCL, y aproximadamente en la mitad de los pacientes los niveles de vitamina D eran menores de 25 ng/mL. Tras agrupar a los pacientes según el IPI y teniendo en cuenta el tratamiento recibido, aquellos pacientes con niveles bajos de vitamina D tuvieron una supervivencia global menor en

comparación con el resto. En otro estudio específicamente dirigido a pacientes de DLBCL, Bittenbring *et al.* (2013) estudiaron una cohorte de 359 pacientes y obtuvieron resultados similares.

2.4.7. El microambiente tumoral

El infiltrado celular del microambiente tumoral parece ser un factor pronóstico en DLBCL. Por ejemplo, Perry, Mitrovic y Chan (2012) estudiaron el estroma del tumor en pacientes con DLBCL y dividieron los casos en dos grupos: el estroma-1, compuesto por un infiltrado de monocitos y macrófagos que predecía un buen pronóstico, y el estroma-2, que se caracterizaba por la presencia de factores que promovían la angiogénesis y predecían un peor pronóstico. A pesar de que el infiltrado de monocitos puede indicar un mejor avance de la enfermedad, se ha encontrado que la presencia de monocitos con una baja expresión de HLA-DR se asocia a un DLBCL más agresivo y a una mayor velocidad en la progresión de la enfermedad (Vaidya y Witzig 2014). Además, un alto recuento absoluto de linfocitos en el momento del diagnóstico se ha asociado a una mejor supervivencia global y libre de enfermedad independientemente del IPI (Kim *et al.* 2007; Cox *et al.* 2008).

También se ha relacionado la pérdida de los genes del MHC-II con un peor pronóstico en DLBCL, que, en última instancia, provoca la disminución de linfocitos T CD8⁺ en el microambiente tumoral. Rimsza *et al.* (2004) explicaron que esto ocurre porque se evitaría la presentación antigénica a los linfocitos T colaboradores, que a su vez activan a los linfocitos T citotóxicos en la respuesta inmune antitumoral. Es lógico pensar, por tanto, que también existiría una disminución de los linfocitos CD4 en pacientes recién diagnosticados.

Otros factores pronósticos de importancia en el microambiente tumoral son las citoquinas, que participan en la activación, proliferación e inhibición celular. En DLBCL se han encontrado diferencias significativas en la expresión de citoquinas entre pacientes pretratados y una cohorte sana; especialmente se ha encontrado la expresión de citoquinas como sIL2-R, IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-12 o VEGF, entre otras (Charbonneau et al. 2012). Más recientemente, algunas de estas citoquinas (TNF, sIL2-R e IL-6) se han vuelto a encontrar como factores de pobre pronóstico de la enfermedad (Dlouhy et al. 2017).

2.5. Tratamientos

Las terapias empleadas en el DLBCL han sido probadas y analizadas a lo largo de los años debido a la dificultad de tratar pacientes con una enfermedad tan biológica y clínicamente heterogénea. Como ocurre en cualquier tipo de cáncer, el objetivo primordial de los tratamientos empleados en esta enfermedad es conseguir la mayor tasa de respuestas completas con la toxicidad más tolerable (Gisselbrecht y Van Den Neste, 2018). Uno de los parámetros empleados para medir la tasa de respuesta y, por tanto, evaluar la eficacia del tratamiento empleado es la tasa de respuesta global (TRG) u objetiva, que engloba a aquellos pacientes que presentan una reducción o desaparición del tamaño del tumor tras recibir el tratamiento; por tanto, únicamente se tienen en cuenta el número de pacientes que presentan respuestas parciales y completas.

En el DLBCL el tratamiento estándar de primera línea es R-CHOP, que es administrado a los pacientes recién diagnosticados con esta enfermedad y con el cual han conseguido responder aproximadamente entre un 60 y un 70%. Para el resto de pacientes, los no respondedores o los que recaen de este tratamiento, la primera

opción es valorar la quimioterapia de rescate y el trasplante autólogo de médula ósea (TAMO); el inconveniente es que un alto porcentaje de este grupo de pacientes no son candidatos al TAMO o progresan del mismo, por lo que no existe un tratamiento estándar para ellos. En estas circunstancias surgen las terapias de segunda línea, entre ellas el R2-GDP.

2.5.1. Tratamiento de primera línea: R-CHOP

Hasta hace dos décadas la quimioterapia de combinación CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona) era el tratamiento empleado en DLBCL, pero la incorporación de rituximab (R-CHOP) aumentó la eficacia del tratamiento y mejoró notablemente los resultados conseguidos en términos de respuesta y supervivencia (Kubuschok, Held, y Pfreundschuh 2015).

Actualmente, la mayoría de los pacientes que son diagnosticados de DLBCL se encuentran en etapas avanzadas de la enfermedad y reciben la terapia R-CHOP (Sehn y Gascoyne 2015). Los componentes de este tratamiento se explican a continuación:

- Rituximab: es un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano y que presenta actividad anti-CD20: se une de forma específica al receptor de membrana CD20 de los linfocitos B e induce su muerte celular por apoptosis (Avivi, Robinson, y Goldstone 2003). Coiffier et al. (2002) compararon en pacientes con DLBCL la eficacia de un tratamiento CHOP añadiendo rituximab con un tratamiento CHOP sin rituximab y observaron que la terapia R-CHOP aumentó la tasa de respuesta completa, disminuyó la tasa de recaída de la enfermedad y no hubo un aumento importante de los efectos tóxicos.
- Ciclofosfamida: es un compuesto que requiere la activación metabólica para ejercer su función como agente inmunosupresor.

Actúa a través de la aldehído deshidrogenasa, altamente expresada en células con alto nivel proliferativo, como las tumorales; hematológicamente, puede producir neutropenia, por lo que se debe administrar junto con un factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF). La terapia basada en ciclofosfamida se usa en múltiples enfermedades, como las autoinmunes o los linfomas no Hodgkin, donde ha demostrado aumentar el número de remisiones completas duraderas en combinación con quimioterapia (Emadi, Jones y Brodsky 2009).

- Doxorubicina: es un fármaco que pertenece a la familia de las antraciclinas y uno de los agentes quimioterápicos más potentes para el tratamiento de muchos tipos de cáncer, como linfomas, leucemias, cáncer de mama, de ovario o gástrico. Actúa sobre los ácidos nucleicos de las células tumorales en división intercalándose entre los pares de bases de las cadenas de ADN para inhibir su transcripción y replicación y generando radicales libres que causan daño oxidativo a las membranas celulares, las proteínas y el ADN (Cagel et al. 2016).
- Vincristina: es un compuesto aislado de la especie *Catharanthus roseus*, una planta endémica de Madagascar. Se emplea en el tratamiento de linfomas, leucemias, tumores cerebrales y algunos tipos de tumores sólidos. Su función antitumoral se debe a sus efectos citotóxicos al unirse a la tubulina, por lo que inhibe el ensamblaje de los microtúbulos y las vías de la dinámica del huso mitótico durante la mitosis, interrumpiendo el ciclo celular (Rao et al. 2019).
- Prednisona: es uno de los corticosteroides sistémicos más utilizados. Se emplea como un agente antiinflamatorio e inmunosupresor y tiene una alta actividad mineralocorticoide, es decir, provoca un aumento de los electrolitos en los líquidos extracelulares y de la reabsorción de agua por los túbulos renales. Actualmente también

se emplea la dexametasona, mucho más potente y de acción más prolongada que la prednisona y con una actividad mineralocorticoide mínima (Liu et al. 2013).

Dependiendo de los factores pronósticos que aportan el IPI y el GEP, el tratamiento con R-CHOP puede provocar una respuesta y una supervivencia a largo plazo diferentes en los pacientes con DLBCL. Con esta terapia, aquellos pacientes con un subtipo GCB de la enfermedad tienen un mejor pronóstico en comparación con aquellos que presentan un subtipo ABC. Por ejemplo, Masir et al. (2019) estudiaron una cohorte de 79 pacientes asiáticos tratados con R-CHOP y observaron que tanto la supervivencia libre de progresión como la supervivencia global era mayor en el subtipo GCB. También se ha estudiado el pobre pronóstico de la enfermedad tras emplear el tratamiento R-CHOP en 167 pacientes que presentaban doble expresión de MYC y BCL2 (Johnson et al. 2012) y en 506 pacientes con triple expresión de MYC, BCL2 y BCL6 (Horn et al. 2013).

2.5.2. Tratamiento de segunda línea: R2-GDP

Los pacientes que no consiguen responder a los tratamientos de primera línea o que recaen tras una respuesta inicial tienen un pronóstico muy desfavorable; por ello, existe una gran variedad de tratamientos de segunda línea o terapias de rescate. La empleada en los pacientes con DLBCL de este estudio se trata de R2-GDP, que surge de añadir lenalidomida al tratamiento R-GDP (rituximab y GDP). La lenalidomida es un fármaco inmunomodulador que deriva de la talidomida y tiene funciones inmunomoduladoras, antineoplásicas, antiangiogénicas y proeritropoyéticas. Como se observa en la Figura 11, la lenalidomida es capaz de inhibir diferentes citoquinas proinflamatorias, como IL-6, IL-12, TNF- α , VEGF o TGF- β , algunas de

ellas con capacidad para iniciar la angiogénesis. También se encarga de promover la proliferación de linfocitos T y NK a través de citoquinas como IL-2 o IFN- γ , permitiendo la generación de la respuesta inmune contra el tumor. El tratamiento GDP es una quimioterapia compuesta por:

- **Gemcitabina**: es un antimetabolito de la pirimidina y un análogo específico del nucleósido desoxicitidina; se utiliza frecuentemente en muchos tipos de tumores sólidos o trastornos hematológicos neoplásicos (Z. Xie et al. 2018). Este fármaco citotóxico permite el incremento de los neoantígenos y su presentación cruzada a través de APC, mejorando la respuesta inmune mediada por células T y generando linfocitos T memoria.
- **Dexametasona**: es un esteroide glucocorticoide con efectos inmunomoduladores que se emplea junto a quimioterapias que incluyen platino (Cook et al. 2016).
- **Cisplatino**: se utiliza en varios tipos de cáncer, como el de vejiga, ovario o los linfomas; su objetivo es entrecruzarse con las bases de purina en el ADN de las células tumorales, de forma que causa daño en el ADN e induce la apoptosis celular (Dasari y Tchounwou, 2014).

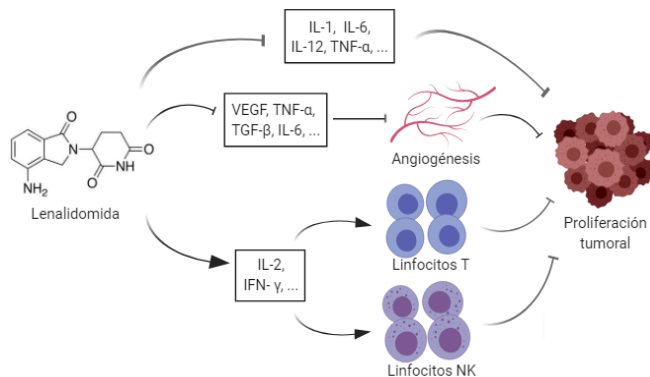


Figura 11. Principales funciones de la lenalidomida en el microambiente tumoral (elaboración propia).

El tratamiento GDP ha sido probado en varios tipos de linfomas, como el extranodal de células T/NK, donde ha demostrado ser válido tanto para pacientes recién diagnosticados de la enfermedad como para aquellos refractarios o en recaída, con bajas toxicidades (Wang et al. 2016). También se ha probado en una cohorte de pacientes refractarios o en recaída de linfoma de Hodgkin y DLBCL; los resultados obtenidos mostraron que esta terapia de rescate puede ser beneficiosa para esos pacientes que no responden al tratamiento inicial o recaen del mismo, ya que aporta una eficacia y una toxicidad favorable. Moccia et al. (2016). Recientemente, se ha demostrado una alta eficacia de GDP en pacientes con linfoma de células B de alto grado de doble y triple hit (reordenamientos de MYC, BCL2 y/o BCL6) (Mitobe et al. 2019).

Dadas las toxicidades tolerables anteriormente comentadas y la eficacia de rituximab descrita por Coiffier et al. (2002) al ser combinada con CHOP, también se ha estudiado la terapia R-GDP. Hou, Wang y Ba (2012) estudiaron 50 pacientes con DLBCL y linfoma folicular refractarios o en recaída, los cuales recibieron el tratamiento R-GDP; el estudio mostró la alta eficacia de esta terapia en términos de supervivencia global y libre de enfermedad, especialmente en los pacientes en recaída. Adam et al. (2018) también observaron la alta efectividad de esta combinación como terapia de rescate en 27 pacientes con DLBCL, linfoma folicular y linfoma de Hodgkin.

Hasta el momento, la única referencia que existe sobre la adición de lenalidomida a la combinación R-GDP se ha reportado en un caso clínico liderado por Yaping Zhang et al. (2018) de un paciente asiático de 49 años al que se le diagnosticó DLBCL CD5⁺ de subtipo ABC, asociado a un mal pronóstico. El paciente resultó ser refractario del tratamiento estándar de primera línea R-CHOP; luego, obtuvo una respuesta parcial cuando se le administró la terapia de rescate R-GDP

y, finalmente, la adición de lenalidomida resultó en una remisión completa de la enfermedad. Dado este caso de DLBCL de mal pronóstico y las características comentadas anteriormente de la lenalidomida, el tratamiento R2-GDP parece ser prometedor para la obtención de respuestas completas en los pacientes refractarios o en recaída del DLBCL.

2.5.2.1. Tratamientos alternativos de segunda línea

Otras de las terapias de rescate que se han probado en DLBCL son las siguientes:

- R-ICE: se trata de la combinación de rituximab con ifosfamida, carboplatino y etopósido. La ifosfamida es un análogo de la ciclofosfamida y el carboplatino es un análogo del cisplatino. Turki et al. (2018) probaron este tratamiento con o sin terapia de altas dosis en pacientes mayores de 60 años y no se observaron diferencias en cuanto a la progresión de la enfermedad tras el primer año de tratamiento en ambos grupos.
- R-ESHAP: es una terapia de rescate que incluye rituximab en combinación con etopósido, metilprednisolona, arabinósido de citosina y cisplatino. La metilprednisolona es un análogo de la prednisona y el arabinósido de citosina es un análogo de la gemcitabina. En un estudio del Grupo Español de Linfomas y Trasplantes de Médula Ósea, Martín et al. (2008) estudiaron en un ensayo clínico 1b el efecto de este tratamiento en dos grupos de pacientes con DLBCL refractarios o en recaída: pretratados y no pretratados con rituximab; aunque la supervivencia global y libre de progresión fue mayor en el último grupo, por lo general se comprobó la seguridad y la eficacia de R-ESHAP. Años más tarde, el mismo grupo probó, en otro ensayo 1b, la adición de

- lenalidomida a R-ESHAP y observaron que era una terapia segura y con tasas de respuestas prometedoras (Martín et al. 2016).
- R-GemOx: es un tratamiento que combina rituximab con gemcitabina y oxaliplatino. Este último es un análogo del cisplatino. Aunque se ha usado anteriormente en DLBCL como terapia de rescate de manera efectiva (El Gnaoui et al. 2007; López et al. 2007), también se ha empleado como tratamiento de primera línea en pacientes con esta enfermedad: en un ensayo clínico fase II, Shen et al. (2018) estudiaron esta terapia en 60 pacientes de avanzada edad, de los cuales la mayoría tenían más de 70 años; teniendo en cuenta la edad de los pacientes, se demostró una alta eficacia del tratamiento obteniéndose una tasa de supervivencia libre de progresión y una supervivencia global a 3 años del 49% y del 65%, respectivamente.

Justificación

II. Justificación

Dado que un tercio de los pacientes con DLBCL no consiguen responder o recaen del tratamiento de primera línea, tal y como se ha explicado en el capítulo introductorio, en este estudio se pretende demostrar la efectividad de la lenalidomida al añadirse a un esquema de quimioterapia estándar, en este caso R-GDP. La lenalidomida es una molécula derivada de la talidomida perteneciente a los IMiD®, una familia de fármacos inmunomoduladores, y presenta efectos inmunomoduladores, antineoplásicos, anti-angiogénicos y pro-eritropoyéticos. Las principales ventajas de la lenalidomida sobre la talidomida son las siguientes:

- Tiene una potencia entre 50 y 2.000 veces superior en sus efectos inmunomoduladores,
- Presenta un perfil de toxicidad más favorable al no causar efectos como somnolencia o neuropatía, sí dados con talidomida.

En la sección 2.5. del capítulo introductorio se mencionan algunas funciones de la lenalidomida en el sistema inmune, entre las que se destacan su capacidad para inhibir la producción de ciertas citoquinas proinflamatorias y promover la activación de la respuesta inmune mediada por los linfocitos T y los linfocitos NK, y su papel como monoterapia o en combinación en ensayos clínicos y otros estudios ya realizados, resaltando su actividad antitumoral en parámetros de eficacia y seguridad.

Para comprobar el efecto de la lenalidomida sobre el sistema inmune y registrar posibles marcadores predictivos o pronósticos de respuesta al tratamiento, nuestro grupo ha monitorizado por citometría de flujo la evolución de ciertos biomarcadores inmunológicos de gran

interés en cáncer, como las células supresoras de origen mieloide o los linfocitos T reguladores, antes, durante y tras el tratamiento en los pacientes refractarios o en recaída de linfoma difuso de células B grandes.

Hipótesis

y

objetivos

III. Hipótesis y objetivos

1. Hipótesis.

Las poblaciones celulares encontradas en sangre periférica de pacientes refractarios o en recaída de linfoma difuso de células B grandes tratados con la terapia de rescate R2-GDP podrían revelar algún posible marcador pronóstico y/o predictivo de respuesta al tratamiento. La hipótesis es que este régimen hará disminuir aquellas poblaciones celulares supresoras de la respuesta inmune, como las células supresoras de origen mieloide y los linfocitos T reguladores, al menos en los pacientes que hayan obtenido una buena respuesta al tratamiento.

2. Objetivos

Los objetivos de esta Tesis Doctoral se centran en el estudio de las poblaciones leucocitarias, en general, y de las células supresoras de origen mieloide, en particular, en sangre periférica de pacientes refractarios o en recaída de linfoma difuso de células B grandes tratados con la terapia de rescate R2-GDP.

Se pretende registrar los parámetros clásicos de eficacia clínica y su relación con los cambios en las poblaciones celulares, de forma dinámica, mediante el análisis por citometría de flujo de las muestras de sangre periférica de los pacientes, obtenidas antes, durante y después del tratamiento.

2.1. Objetivos principales

1. Evaluación de la tasa de respuesta global para determinar la eficacia del tratamiento de rescate empleado.
2. Evaluación y comparativa de los niveles de células supresoras de origen mieloide con sujetos sanos (estudio caso-control).
3. Evaluación de los cambios acontecidos en los niveles de las células supresoras de origen mieloide en respuesta al tratamiento, según el nivel de vitamina D y según inmunofenotipo del tumor estudiado, que pudieran establecerse como factor pronóstico y/o predictivo de respuesta en la enfermedad.
- 4.

2.1. Objetivos secundarios

1. Establecer la relación entre la respuesta al tratamiento y el inmunofenotipo del tumor, que pudiera arrojar información predictiva de respuesta.
2. Evaluación de un estudio caso-control en el resto de poblaciones celulares (neutrófilos, monocitos y subpoblaciones linfocitarias).
3. Evaluación de los cambios acontecidos las poblaciones celulares mencionadas en el punto anterior en respuesta al tratamiento, según los niveles de vitamina D y según el inmunofenotipo del tumor estudiado, que pudieran establecerse como factor pronóstico y/o predictivo de respuesta en la enfermedad.
4. Evaluación de un estudio caso-control de vitamina D y su correlación con la respuesta al tratamiento y con el inmunofenotipo del tumor estudiado, que pudieran arrojar información como posible marcador pronóstico.

Metodología

IV. Metodología

1. Diseño del estudio.

Esta Tesis Doctoral se enmarca en el estudio titulado “Ensayo fase II para valorar la combinación de la lenalidomida con R-GDP (R2-GDP) en pacientes con linfoma difuso de células grandes B refractarios o en recaída (R/R DLBCL) no candidatos a quimioterapia de altas dosis y trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (Nº EudraCT: 2014-001620-29). Se trata de un ensayo clínico fase II, nacional, multicéntrico, abierto y de un solo brazo, cuyo promotor es el Grupo Oncológico para el Tratamiento y el Estudio de los Linfomas (GOTEL).

2. Sujetos de estudio.

2.1. Pacientes.

Se estudiaron pacientes con linfoma difuso de células B grandes refractarios o en recaída, no candidatos a quimioterapia a altas dosis y trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, que habían progresado al menos a un tratamiento previo anti-CD20 y quimioterapia. Todos los pacientes fueron reclutados en diferentes centros a nivel nacional.

2.1.1. Criterios de inclusión.

Los pacientes que fueron candidatos a participar en el ensayo clínico debieron cumplir todos los requisitos siguientes:

1. Tener edad igual o mayor a 18 años.
2. Haber sido diagnosticado previamente de DLBCL mediante biopsia, incluyendo estudio inmunohistoquímico y con demostración de positividad a CD20.
3. Pacientes con DLBCL refractarios o en recaída que hayan recibido al menos un tratamiento de primera línea que incluyera quimioterapia y anticuerpos monoclonales anti-CD20. La biopsia de recaída era recomendable, pero no obligatoria.
4. Pacientes no candidatos a trasplante autólogo de células hematopoyéticas, a criterio del médico responsable.
5. Presentar un estado funcional ECOG ≤ 2 .
6. Tener una expectativa de esperanza de vida superior a 3 meses.
7. Aceptar las medidas de anticoncepción habituales en los ensayos realizados con lenalidomida.
8. En caso de ser mujer con capacidad de gestación, acreditar una prueba negativa para embarazo en el momento del screening.
9. Firmar el Consentimiento Informado para su inclusión en el estudio.

2.1.2. Criterios de exclusión.

Los pacientes no fueron candidatos a unirse al estudio si cumplieron alguno de los siguientes criterios:

1. Pacientes que a criterio del investigador puedan ser susceptibles de TAMO (Trasplante Autólogo de Médula Ósea) en algún momento de la evolución de la enfermedad.
2. Pacientes con función renal, hepática o hematológica inadecuada, y/o mostrando alguna de los siguientes parámetros de laboratorio (sin permitirse el uso de factores estimulantes de colonias ni otras medidas de soporte para la inclusión de los pacientes):
 - Recuento absoluto de neutrófilos < 1.000 células/mm³;
 - Nivel de plaquetas $< 75.000/$ mm³;

- Nivel de transaminasas glutámicooxalacéticas (GOT) o transaminasas glutámico-pirúvica (GPT) >5 veces el nivel normal;
 - Bilirrubina total > 2 mg/dl o bilirrubina conjugada > 0.8mg/dl, excepto si existe anemia hemolítica;
 - Aclaramiento de creatinina < 30 ml/minuto.
3. Estado funcional ECOG 3 o 4.
 4. Alguna otra condición médica grave, anomalía de laboratorio o enfermedad psiquiátrica que dificulte la obtención del consentimiento informado por parte del paciente.
 5. Infección sistémica que no se haya resuelto >2 meses antes de iniciar el tratamiento de ensayo a pesar de tratamiento antiinfeccioso adecuado.
 6. Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.
 7. Rechazo a la utilización de los métodos anticonceptivos recomendados según el protocolo.
 8. Haber recibido algún tratamiento experimental en los 28 días previos a iniciar el tratamiento del ensayo clínico.
 9. Afectación del sistema nervioso central confirmada por citología de líquido cefalorraquídeo o pruebas de imagen.
 10. Seropositividad para VIH, hepatitis B (VHB) o hepatitis C (VHC). Los pacientes con serología positiva para VIH, antígeno de superficie del VHB (HBsAg) y serología positiva para VHC serán excluidos del estudio. Para el resto de situaciones, tener en cuenta las siguientes consideraciones:
 - Si el HBsAg es negativo pero los anticuerpos anti-core (HBcAb) son positivos y los anticuerpos frente al antígeno de superficie son negativos (HBsAb), se realizará una prueba de ADN del VHB. Si el ADN del VHB resulta positivo el paciente no sería incluíble en el estudio;
 - Los pacientes con HBsAg negativo, HBcAb positivo y HBsAb negativo con ADN del VHB indetectable serían incluíbles. La

quimioprofilaxis con lamivudina en este subgrupo de pacientes sería aceptable, quedaría a criterio del investigador y no constituiría un criterio de exclusión del estudio;

- Si ambos tipos de anticuerpos (HBcAb y HBsAb) son positivos (indicativo de infección pasada), el paciente podrá ser incluido en el estudio.
- Los pacientes con serología positiva para VHC pero RNA negativo sí serían incluibles.

11. Historial previo de enfermedad maligna, salvo que el paciente haya estado libre de enfermedad ≥ 3 años. Exceptuando los carcinomas basocelular de piel, escamoso de piel, in situ del cérvix, in situ de la mama y de próstata diagnosticado incidentalmente.

12. Enfermedad intercurrente no controlada como, por ejemplo infección activa que requiera antibióticos parenterales; diabetes mellitus no controlada; insuficiencia cardiaca crónica sintomática; angina de pecho inestable o realización de angioplastia, *stent* o infarto de miocardio en los últimos 6 meses; enfermedad tromboembólica grado 3-4 en los últimos 6 meses o neuropatía previa grado ≥ 2 .

13. Haber recibido alguno de los siguientes tratamientos en el periodo especificado previo al día 1 del estudio:

- Cualquier quimioterapia en las 2 semanas previas;
- Nitrosoureas en las 6 semanas previas;
- Anticuerpos monoclonales en las 8 semanas previas;
- Radioterapia externa en las 3 semanas previas;
- Radioinmunoconjugados en las 12 semanas previas.

2.1.3. Criterios de retirada

El tratamiento se vio interrumpido en los pacientes si ocurrió alguna de las siguientes situaciones:

1. Existencia de progresión clínica y/o radiológica de la enfermedad;
2. Retraso en el tratamiento superior a tres semanas por una toxicidad que no se recupera a grado ≤ 2 , excepto en toxicidades medulares;
3. Incurrimiento por parte del paciente en alguna de las condiciones que constituyen criterio de exclusión del estudio;
4. Aparición de acontecimientos adversos cuya naturaleza o intensidad hacen recomendable la retirada del tratamiento;
5. Retirada del consentimiento por parte del paciente o no asistencia a dos o más visitas de control siguientes a la admisión en el estudio.

2.2. Cohorte sana.

Se estudió un grupo de personas compuesto por profesionales sanitarios, docentes de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla y pacientes del Servicio de Traumatología del Hospital Virgen Macarena que no padecían enfermedad oncológica conocida y que cumplían con las características demográficas y epidemiológicas demandadas según la muestra de pacientes con DLBCL refractario o en recaída analizada, como país de nacimiento, raza, sexo y rango de edad.

3. Protocolo terapéutico.

3.1. Fase de inducción: esquema R2-GDP.

Los pacientes que fueron incluidos en el estudio recibieron el siguiente esquema de tratamiento:

- Lenalidomida: 10 mg/día vía oral (vo), durante 14 días (día +1 a día +14), ciclos cada 21 días.
- Rituximab: 375 mg/m² vía intravenosa (iv), día primero de cada ciclo.
- Cisplatino: 60 mg/m², iv, día primero de cada ciclo.
- Gemcitabina: 750 mg/m², iv, día primero y octavo.
- Dexametasona: 20 mg cada 24 horas, vo, día primero a tercero.
- G-CSF: 30 mUI diarios, durante 10 días, administrados en 2 tandas: día +2 a +6 y día +9 a +13.

Los ciclos se repitieron cada 21 días y se administraron hasta alcanzar 6 ciclos en la fase de inducción. Si por motivos de toxicidad el paciente finalizó antes de los 6 ciclos previstos el tratamiento de inducción, siempre que se alcanzaran un mínimo de 3 ciclos de R2-GDP, el paciente pudo continuar en el estudio y pasar a la fase de mantenimiento si no se hubiera demostrado progresión de la enfermedad. Si el número de ciclos de R2-GDP fue ≤ 2 , el paciente fue retirado del estudio.

La Tasa de Respuesta Global se evaluó midiendo la respuesta al tratamiento tras el tercer ciclo y la finalización del tratamiento de inducción siguiendo los criterios del *Internacional Working Group Criteria* (Cheson et al. 2007).

3.2. Fase de mantenimiento.

En los 28 días siguientes a la finalización de la fase de inducción se realizó una tomografía por emisión de positrones, preferentemente entre los días +14 y +28, y transcurridos 28 días (+/- 7) del fin de tratamiento de inducción, en caso de lograrse una respuesta completa, parcial o la estabilización de la enfermedad, se comenzó la fase de mantenimiento, que consistió en:

- Lenalidomida: 10 mg/día, vo, durante 21 días (día +1 a +21) en ciclos cada 28 días. La fase de mantenimiento continuó hasta progresión de la enfermedad o aparición de toxicidad inaceptable. Asimismo, una vez transcurridos 2 años de mantenimiento con lenalidomida se realizó un PET de reevaluación y, en caso de objetivarse remisión completa, se procedió a suspender el tratamiento de mantenimiento con lenalidomida. En caso de no obtenerse respuesta completa, se continuó con el tratamiento de mantenimiento hasta progresión de enfermedad o toxicidad inaceptable.

4. Materiales.

Cada envío recepcionado de los diferentes centros participantes contenía dos tubos con EDTA, con la muestra de sangre periférica que posteriormente se analizó, y otro tubo con activador de coagulación que contenía suero, que fue utilizado para realizar el análisis de vitamina D. Por cada muestra de sangre periférica se realizó un hemograma y un marcaje celular con anticuerpos monoclonales para su análisis por citometría de flujo; se empleó el citómetro de flujo FACSCanto™ II y los resultados obtenidos se recogieron con el *software* BD FACSDiva™

4.1. Estudio de células supresoras de origen mieloide.

Los anticuerpos monoclonales empleados para el marcaje de las MDSC son los siguientes:

- PerCP-Cy™5.5 Mouse Anti-Human CD 45 (Ref: 564105; BD Pharmingen™);

- PE-CyTM7 Mouse Anti-Human HLA-DR (Ref: 560651; BD PharmingenTM);
- APC-CyTM7 Rat Anti-CD11b (Ref: 557657; BD PharmingenTM);
- PE Mouse Anti-Human CD 33 (Ref: 555450; BD PharmingenTM);
- FITC Mouse Anti-Human CD 14 (Ref: 555397; BD PharmingenTM);
- APC Mouse Anti-Human CD 15 (Ref: 551376; BD PharmingenTM).

4.2. Estudio de linfocitos T reguladores.

El anticuerpo monoclonal empleado para el marcaje de los linfocitos T reguladores es el siguiente:

- Human Regulatory T Cell Cocktail (Ref: 560249; BD PharmingenTM). Contiene:
 - FITC Anti-Human CD4;
 - PE-CyTM7 anti-Human CD25;
 - Alexa Fluor® 647 anti-Human CD127.

Aunque este anticuerpo monoclonal no incluye el factor de transcripción Foxp3, reconocido marcador de las células de interés, se ha decidido nombrar a estas células como linfocitos T reguladores por varias razones: por un lado, el marcaje de Foxp3 requiere la permeabilización de la membrana celular, lo que las haría inutilizables en posibles aplicaciones posteriores a su cuantificación por citometría de flujo. Por otro lado, CD127, presente en el anticuerpo monoclonal empleado, fue identificado como un buen marcador para el aislamiento de linfocitos T reguladores por citometría de flujo con la estrategia de gateo CD4⁺CD25⁺CD127⁻. La expresión de CD127 se correlaciona de forma inversa con Foxp3 (Liu et al., 2006), por lo que gatear la región negativa para CD127 es adecuado para garantizar la presencia de Foxp3 en la región celular seleccionada.

4.3. Estudio de otras subpoblaciones linfocitarias.

Se analizaron subpoblaciones de linfocitos T, B y NK empleando el siguiente anticuerpo monoclonal:

- BD Multitest™ 6-Color TBNK (Ref: 337166; BD Multitest™).
Contiene:
 - FITC / CD3;
 - PE / CD16 + PE / CD56;
 - PerCP-Cy™5.5 / CD45;
 - PE-Cy™7 / CD4;
 - APC / CD19;
 - APC-Cy™7 / CD8.

4.4. Estudio de otras poblaciones celulares.

Se realizó un hemograma de cada muestra con el analizador hematológico XN-1000 Pure (Sysmex Europe GMBH).

4.5. Estudio de vitamina D

Se midieron los niveles de vitamina D basales de los pacientes con DLBCL refractarios o en recaída y los del grupo control en el dispositivo Liaison® (DiaSorin), a través de un análisis inmunométrico por quimioluminiscencia automatizado.

4.6. Otros reactivos empleados.

Para el procesamiento de las muestras de sangre periférica por citometría de flujo también se emplearon los siguientes reactivos:

- Tampón fosfato salino (PBS 1X).
- BD FACSTTM Lysing Solution 10X Concentrate (Ref: 349202; BD FACSTTM)

5. Procedimiento.

5.1. Estudio de poblaciones celulares por citometría de flujo.

Por cada paciente incluido en el estudio se realizaron tres análisis por citometría de flujo (antes, durante y tras el tratamiento) correspondientes a las extracciones basal, ciclo 3 y fin de inducción; para el grupo control se realizó un único análisis. Las muestras fueron procesadas de acuerdo con el protocolo de rutina empleado en el Laboratorio de Citometría de Flujo del Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Virgen Macarena. El procedimiento es el siguiente:

1. Pasar 50 μ L de muestra de sangre periférica a cuatro tubos de ensayo, uno para cada estudio citométrico.
2. Añadir los anticuerpos monoclonales correspondientes a cada tubo de ensayo, tal como se muestra en la sección 4, con los volúmenes recomendados por el fabricante.
3. Agitar en vortex e incubar 15 minutos en oscuridad.

4. Añadir en cada tubo de ensayo 2 mL de BD FACS™ Lysing Solution 10X Concentrate para lisar los eritrocitos, que podrían influir en la obtención de los datos.
5. Agitar en vortex e incubar 3 minutos en oscuridad.
6. Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm y desechar sobrenadante.
7. Añadir 2 mL de PBS 1X para lavar el pellet celular y agitar en vortex.
8. Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm y desechar sobrenadante.
9. Añadir 0,5 mL de PBS 1X y agitar en vortex.
10. Adquirir 100.000 eventos en el citómetro de flujo para obtener los resultados.

5.2. Estudio de otras subpoblaciones celulares.

Con el hemograma se obtuvo un recuento absoluto de las otras poblaciones celulares de interés: leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos totales y monocitos.

5.3. Estudio de vitamina D.

Las muestras de suero empleadas para el estudio de la vitamina D que se recibieron, se alicuotaron en criotubos identificados y fueron almacenados a -80°C hasta el momento de los análisis, los cuales se realizaron durante el mismo día y únicamente de las muestras basales para comprobar los niveles de vitamina D previos al inicio del tratamiento.

6. Tratamiento de los datos.

6.1. Cálculo del tamaño muestral.

De acuerdo con el protocolo establecido en el ensayo clínico, el tamaño muestral se calculó teniendo en cuenta un diseño binomial de Simon en dos etapas, empleando la tasa de respuesta global al tratamiento como variable principal. Se asumió un error $\alpha=0.05$ y un error $\beta=0.8$. Se consideró que la actividad del tratamiento experimental no era estadísticamente superior al esquema estándar si la tasa de la suma de respuestas completas más parciales se situara entre el 35 y el 50% (H_0), asumiéndose que el tratamiento experimental era superior si la tasa de respuestas fuera mayor o igual al 50% (H_1). Tras realizar un análisis de futilidad con los primeros 27 pacientes reclutados, se observó una tasa de respuestas completas y/o parciales mayor o igual a 10, por lo que se continuó con el estudio hasta completar el reclutamiento previsto, de 79 pacientes.

Para el grupo control se utilizó un tamaño muestral de 20 personas, que no fue ampliado puesto que no se observaron diferencias importantes en sus niveles celulares, por lo que se consideró representativo de la población de edad similar.

6.2. Análisis estadístico.

Los pacientes que se han incluido para hacer el análisis estadístico son los siguientes:

- Pacientes por intención de tratar: son aquellos que recibieron al menos una dosis de tratamiento y de los que se dispone de una valoración posterior a su entrada en el estudio, aunque posteriormente cumplieran alguno de los criterios de retirada que

aparecen en la sección 2.3. del capítulo introductorio, como, por ejemplo, la interrupción prematura por la aparición de efectos adversos graves.

- Pacientes por protocolo o completos: son aquellos que recibieron los 3 ciclos de tratamiento y de los que se dispone de una valoración posterior, habiendo cumplido todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión o retirada del estudio.

Los resultados fueron analizados con el *software* estadístico IBM SPSS, versión 25. Se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para el análisis de normalidad de los valores. Como la distribución de los datos no fue normal, se aplicaron tests de pruebas no paramétricas: el test de Wilcoxon para muestras relacionadas en dos momentos y la prueba U de Mann-Whitney para las muestras independientes. Con ambas pruebas estadísticas se consideró significativo un valor $p \leq 0,05$.

Dado el tipo de estudio que aquí se trata se podría realizar un análisis estadístico empleando una prueba no paramétrica para muestras repetidas en tres momentos (test de Friedman). Sin embargo, el interés principal del estudio se centra en comprobar si realmente hay cambios en los biomarcadores inmunológicos tras el uso del tratamiento, para lo que habría que comparar los niveles celulares en dos momentos diferentes: antes de iniciar la terapia (aunque también se ha hecho para el tercer ciclo de tratamiento) con el final de la inducción. Por esta razón, se empleó el test de Wilcoxon.

7. Limitaciones del estudio.

Este estudio, por su propia naturaleza, ha generado un gran volumen de datos. Dada la heterogeneidad del DLBCL y las diferentes

respuestas al tratamiento obtenidas es posible que algunas de las relaciones establecidas no arrojen resultados estadísticamente significativos, a no ser que las diferencias sean excesivamente grandes.

8. Tratamiento de los datos.

8.1. Comité ético.

El estudio se realizó en conformidad con los principios de la Declaración de Helsinki adoptada en junio de 1964 por la 18ª Asamblea Médica Mundial de Helsinki (Finlandia) y enmendada en octubre de 1975 en la 29ª Asamblea Médica Mundial de Tokio (Japón); en octubre de 1983 en la 35ª Asamblea Médica Mundial de Venecia (Italia), en septiembre de 1989 en la 41ª Asamblea Médica Mundial de Hong Kong (China), en octubre de 1996 en la 48ª Asamblea General Somerset West (Sudáfrica) y en octubre de 2000 en la 52ª Asamblea General de Edimburgo (Escocia). El informe favorable del Comité Ético para llevar a cabo el estudio se muestra en el Anexo I.

8.2. Consentimiento informado.

Antes de que el investigador iniciara cualquier tipo de investigación correspondiente al ensayo clínico fue necesario informar detalladamente al paciente y obtener su consentimiento firmando el modelo adjunto en el Anexo II.

Resultados

V. Resultados

TESIS SOMETIDA A CONFIDENCIALIDAD

Discusión de resultados

VI. Discusión de resultados

TESIS SOMETIDA A CONFIDENCIALIDAD

Conclusiones

VII. Conclusiones

En vista de los resultados obtenidos se pueden sacar las siguientes conclusiones:

1. El sistema inmune juega un papel fundamental tanto en la eliminación como en la progresión de las células tumorales. Por ello se hace necesaria su estimulación a través de inmunoterapias, con la finalidad de que ejerza una respuesta inmune activa contra el tumor.
2. La eficacia del tratamiento de rescate R2-GDP es prometedora basándonos en los datos de las respuestas obtenidas, con una TRO del 67% (33% de respuestas completas y 34% de respuestas parciales).
3. Existen diferencias significativas en los niveles de determinados conjuntos celulares en sangre periférica según la respuesta al tratamiento obtenida, como las MDSC, por lo que parecen ser un potencial marcador de respuesta al tratamiento, así como una importante diana terapéutica contra la progresión tumoral.
4. La comparación con el grupo control ha permitido comprobar el alto estado de inmunosupresión de los pacientes, ya que se han encontrado diferencias significativas en muchas de las poblaciones celulares analizadas, especialmente en las subpoblaciones linfocitarias (T, Treg, B, NK) y las MDSC.
5. Aunque son necesarios más estudios, los niveles de vitamina D parecen tener relación con el cáncer. En este caso, la mayoría de los pacientes que progresaron presentaron un déficit vitamínico. Además, una alta concentración de vitamina D se correlacionó con el fenotipo GCB, asociado a una mejor respuesta al tratamiento.

Bibliografía

VIII. Bibliografía

- Adam JP, Taillefer V, Emond M, Leblanc MH, Besner-Morin O, Doucet S. Gemcitabine, dexamethasone, cisplatin +/- rituximab (GDP +/- R) is highly effective as a mobilization regimen in relapsed or refractory lymphoma (COLLYM STUDY). *Blood*. 2018; 132(1).
- Afshar-Kharghan V. The role of the complement system in cancer. *J Clin Invest*. 2017; 127(3): 780-9.
- Akbas EM, Gungor A, Ozcicek A, Akbas N, Askin S, Polat M. Vitamin D and inflammation: evaluation with neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio. *Arch Med Sci*. 2016; 12(4): 721-7.
- Al-Nimer MSM, HamaSalih RM. Effects of vitamin D3 supplementation on the hematological indices in women presented with iron deficiency anemia: an open-labeled clinical trial. *J Pharm Negative Results*. 2019; 10(1): 47-51.
- Al-Saleem TI, Dulaimi E, Millenson MM, Smith MR, Judd J, Li T, et al. Low blood absolute CD4 counts is associated with inferior progression free survival in diffuse large B-cell lymphoma independent of age and IPI. *Blood*. 2014; 124(21): 5420.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000; 403(6769): 503-11.
- Alves AS, Ishimura ME, Duarte YAO, Bueno V. Parameters of the immune system and vitamin D levels in old individuals. *Front Immunol*. 2018; 9: 1-14.
- Anani W, Shurin MR. Targeting myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2017; 1036: 105-28.
- Annibali O, Hohaus S, Marchesi F, Cantonetti M, Di Rocco A, Tomarchio V, et al. The neutrophil/lymphocyte ratio ≥ 3.5 is a prognostic marker in diffuse large B-cell lymphoma: a retrospective analysis from the database of the Italian regional network 'Rete Ematologica del Lazio per i Linfomi' (RELLI). *Leuk Lymphoma*. 2019; 1: 1-9.

- Annunziato F, Romagnani C, Romagnani S. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2015; 135(3): 626-635.
- Aragon-Sanabria V, Kim GB, Dong C. From cancer immunoediting to new strategies in cancer immunotherapy: the roles of immune cells and mechanics in oncology. *Adv Exp Med Bio*. 2018; 1092: 113-38.
- Aranow C. Vitamin D and the Immune System. *J Investig Med*. 2011; 59(6): 881-6.
- Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature*. 2015; 517(7534): 293-301.
- Asadzadeh Z, Mohammadi H, Safarzadeh E, Hemmatzadeh M, Mahdian-Shakib A, Jadidi-Niaragh F, et al. The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. *Cell Immunol*, 2017; 322: 15-25.
- Aukema SM, Siebert R, Schuurin E, Van Imhoff GW, Kluijn-Nelemans HC, Boerma EJ, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood*. 2011; 117(8): 2319-31.
- Avivi I, Robinson S, Goldstone A. Clinical use of rituximab in haematological malignancies. *Brit J Cancer*. 2003; 89(8): 1389-94.
- Azuma Y, Nakaya A, Fujita S, Satake A, Nakanishi T, Tsubokura Y, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) fails to predict outcome of diffuse large B cell lymphoma. *Leuk Res Rep*. 2019; 12: 100173.
- Azzaoui I, Uhel F, Rossille D, Pangault C, Dulong J, Le Priol J, et al. T-cell defect in diffuse large B-cell lymphomas involves expansion of myeloid-derived suppressor cells. *Blood*. 2016; 128(8): 1081-92.
- Baecklund E, Smedby KE, Sutton LA, Askling J, Rosenquist R. Lymphoma development in patients with autoimmune and inflammatory disorders - What are the driving forces? *Semin Cancer Biol*. 2014; 24(2014): 61-70.
- Baraka A, Salem HM. Clinical significance of T-regulatory cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Egypt J Immunol*. 2011; 18(2): 23-30.
- Baras AS, Drake C, Liu JJ, Gandhi N, Kates M, Hoque MO, et al. The ratio of CD8 to Treg tumor-infiltrating lymphocytes is associated with

- response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy in patients with muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Oncol Immunology*. 2016; 5(5): e1134412.
- Behl D, Ristow K, Markovic SN, Witzig TE, Habermann TM, Colgan JP, et al. Absolute lymphocyte count predicts therapeutic efficacy of rituximab therapy in follicular lymphomas. *Brit J Haematol*. 2007; 137(5): 409-15.
 - Beltrán BE, Paredes S, Cotrina E, Sotomayor EM, Castillo JJ. The impact of the neutrophil:lymphocyte ratio in response and survival of patients with de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia Res*. 2018; 67: 82-5.
 - Bittenbring JT, Altmann B, Neumann F, Achenbach M, Reichrath J, Ziepert M, et al. 25-OH-vitamin-D deficiency impairs rituximab-mediated cellular cytotoxicity and is associated with an inferior outcome of elderly DLBCL patients treated with rituximab. *Blood*. 2013; 122(21): 1819.
 - Bittenbring JT, Neumann F, Altmann B, Achenbach M, Reichrath J, Ziepert M, et al. Vitamin D deficiency impairs rituximab-mediated cellular cytotoxicity and outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with but not without rituximab. *J Clin Oncol*. 2014; 32(29): 3242-8.
 - Blattner C, Fleming V, Weber R, Himmelhan B, Altevogt P, Gebhardt C, et al. CCR5+ myeloid-derived suppressor cells are enriched and activated in melanoma lesions. *Cancer Res*, 2018; 78(1): 157-67.
 - Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of Antigen Processing. *Annu Rev Immunol*. 2013; 31: 443-73.
 - Boltežar L, Prevodnik VK, Perme MP, Gašljević G, Novaković BJ. Comparison of the algorithms classifying the ABC and GCB subtypes in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncol Lett*. 2018; 15(5): 6903-12.
 - Bonini C, Mondino A. Adoptive T-cell therapy for cancer: the era of engineered T cells. *Eur J Immunol*. 2015; 45(9), 2457-69.
 - Boulassel MR, Al Qarni, Burney I, Khan H, Al-Zubaidi A, Al Naamani A, et al. Levels of regulatory T cells and invariant natural killer cells and their associations with regulatory B cells in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Mol Clin Oncol*. 2018; 9(6): 677-82.

- Bowzyk Al-Naeeb A, Ajithkumar T, Behan S, Hodson DJ. Non-Hodgkin lymphoma. *BMJ Brit Med J.* 2018; 362, k3204.
- Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun.* 2016; 7: 12150.
- Brosseau C, Dousset C, Touzeau C, Maïga S, Moreau P, Amiot M, et al. Combination of lenalidomide with vitamin D3 induces apoptosis in mantle cell lymphoma via demethylation of BIK. *Cell Death Dis.* 2014; 5: e1389.
- Bruns H, Böttcher M, Qorraj M, Fabri M, Jitschin S, Dindorf J, et al. CLL-cell-mediated MDSC induction by exosomal miR-155 transfer is disrupted by vitamin D. *Leukemia.* 2017; 31(4): 985-8.
- Bruns H, Büttner M, Fabri M, Mougiakakos D, Bittenbring JT, Hoffmann MH, et al. Vitamin D-dependent induction of cathelicidin in human macrophages results in cytotoxicity against high-grade B cell lymphoma. *Sci Transl Med.* 2015; 7(282): 282ra47.
- Budhwar S, Verma P, Verma R, Rai S, Singh K. The Yin and Yang of myeloid derived suppressor cells. *Front Immunol.* 2018; 9: 2776.
- Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Progr Exp Tumor Res.* 1970; 13: 1-27.
- Busch A, Zeh D, Janzen V, Mügge LO, Wolf D, Fingerhut L, et al. Treatment with lenalidomide induces immunoactivating and counter-regulatory immunosuppressive changes in myeloma patients. *Clin Exp Immunol.* 2014; 177(2); 439-53.
- Cagel M, Grotz E, Bernabeu E, Moretton MA, Chiappetta DA. Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. *Drug Discov Today.* 2016; 22(2): 270-81.
- Caimi PF, Hill BT, Hsi ED, Smith MR. Clinical approach to diffuse large B cell lymphoma. *Blood Rev,* 2016; 30(6): 477-91.
- Caldera L, León-Ponte M, Acquatella G, Bianco N, Blanca I. Bone marrow and peripheral blood natural killer cell activity in lymphomas. Its response to IL-2. *Clin Exp Immunol.* 1992; 88(1): 143-8.

- Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011; 117(19): 5019-32.
- Cantorna MT. Why do T cells express the vitamin D receptor? *Ann N Y Acad Sci*. 2011; 1217: 77-82.
- Cantorna MT, Snyder L, Lin YD, Yang L. Vitamin D and 1,25(OH)₂D regulation of T cells. *Nutrients*. 2015; 7(4): 3011-21.
- Cao Y, Du Y, Liu F, Feng Y, Cheng S, Guan S, et al. Vitamin D aggravates breast cancer by inducing immunosuppression in the tumor bearing mouse. *Immunotherapy*. 2018; 10(7): 555-66.
- Carbone A, Gloghini A, Kwong YL, Younes A. Diffuse large B cell lymphoma: using pathologic and molecular biomarkers to define subgroups for novel therapy. *Ann Hematol*. 2014; 93(8): 1263-77.
- Carreno BM, Magrini V, Becker-Hapak M, Kaabinejadian S, Hundal J, Petti AA, et al. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells. *Science*. 2015; 348(6236): 803-8.
- Cha Z, Li C, Zang Y, Gu H, Guo H, Li J, et al. Adaptive B cell responses in rituximab-treated diffuse large B cell lymphoma patients during complete remission. *Tumor Biol*. 2016; 37(1): 829-35.
- Chang C, Wu SY, Kang YW, Lin KP, Chen TY, Medeiros LJ, et al. High levels of regulatory T cells in blood are a poor prognostic factor in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2015; 144(6): 935-44.
- Chao C, Silverberg MJ, Xu L, Chen LH, Castor B, Martínez-Maza O, et al. A comparative study of molecular characteristics of diffuse large B-cell lymphoma from patients with and without human immunodeficiency virus infection. *Clin Cancer Res*. 2015; 21(6): 1429-37.
- Charbonneau B, Maurer MJ, Ansell SM, Slager SL, Fredericksen ZS, Ziesmer SC, et al. Pretreatment circulating serum cytokines associated with follicular and diffuse large B-cell lymphoma: a clinic-based case-control study. *Cytokine*. 2012; 60(3): 882-9.

- Chen PT, Hsieh CC, Wu CT, Yen TC, Lin PY, Chen WC, et al. $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 inhibits esophageal squamous cell carcinoma progression by reducing IL6 signaling. *Mol Cancer Ther.* 2015; 14(6), 1365-75.
- Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol.* 2007; 25(5): 579-85.
- Chiu H, Trisal P, Bjorklund C, Carrancio S, Toraño EG, Guarinos C, et al. Combination lenalidomide-rituximab immunotherapy activates anti-tumour immunity and induces tumour cell death by complementary mechanisms of action in follicular lymphoma. *Brit J Haematol.*2019; 185(2): 240-53.
- Chong EA, Ahmadi T, Aqui NA, Nasta SD, Svoboda J, Walsh KM, et al. High response rate to combination lenalidomide-rituximab in Fc γ RIIIa-F carriers with indolent or mantle cell lymphomas previously refractory to rituximab. *Blood.*2013;122(21):250.
- Chong EA, Ahmadi T, Aqui NA, Svoboda J, Nasta SD, Mato AR, et al. Combination of lenalidomide and rituximab overcomes rituximab resistance in patients with indolent B-cell and mantle cell lymphomas. *Clin Cancer Res.* 2015; 21(8):1835-42.
- Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. *Physiol Rev.* 2016; 96(1):365-408.
- Coiffier B, Lepage E, Brière J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *New Engl J Med.* 2002; 346(4): 235-42.
- Collin M. Immune checkpoint inhibitors: a patent review (2010-2015). *Expert Opin Ther Pat.*2016; 26(5): 555-64.
- Cook AM, McDonnell AM, Lake RA, Nowak AK. Dexamethasone co-medication in cancer patients undergoing chemotherapy causes

- substantial immunomodulatory effects with implications for chem-immunotherapy strategies. *OncolImmunology*, 2016;5(3): e1066062
- Cox MC, Pelliccia S, Alma E, Monarca B, Battella S, La Scaleia R, et al. Tumor-associated and immunochemotherapydependent long-term alterations of the peripheral blood NK cell compartment in DLBCL patients. *OncolImmunology*. 2015; 4(3): 1-12.
 - Cox MC, Nofroni I, Ruco L, Amodeo R, Ferrari A, La Verde G, et al. Low absolute lymphocyte count is a poor prognostic factor in diffuse-large-B-cell-lymphoma. *Leukemia Lymphoma*. 2008; 49(9): 1745-51.
 - Crump M, Neelapu SS, Farooq U, Van Den Neste E, Kuruvilla J, Westin J, et al. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood*, 2017; 130(16): 1800-8.
 - Cubillos-Zapata C, Avendaño-Ortiz J, Arribas-Jiménez C, Hernández-Jiménez E, Toledano V, López-Collazo E, et al. CC-122 immunomodulatory effects in refractory patients with diffuse large B-cell lymphoma. *OncolImmunology*. 2016; 5(12): 12-6.
 - Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014, 740(1): 364-78.
 - Daussy C, Damotte D, Molina TJ, Roussel M, Fest T, Varin A, et al. CD4:CD8 T-cell ratio differs significantly in diffuse large B-cell lymphomas from other lymphoma subtypes independently from lymph node localization. *Int Trends Immun*. 2013; 1(2): 45-8.
 - De la Cruz-Merino L, Chiesa M, Caballero R, Rojo F, Palazón N, Carrasco FH, et al. Breast cancer immunology and immunotherapy: current status and future perspectives. *Int Rev Cel Mol Bio*. 2017; 331: 1-53.
 - De la Cruz-Merino L, Palazón-Carrión N, Henao-Carrasco F, Nogales-Fernández E, Álamo-de la Gala M, Vallejo-Benítez A, et al. New horizons in breast cancer: the promise of immunotherapy. *Clin Transl Oncol*. 2019; 21(2): 117-25.
 - Van den Broek T, Borghans JA., Van Wijk F. The full spectrum of human naive T cells. *Nat Rev Immunol*. 2018; 18(6): 363–73.

- Desfrancois J, Moreau-Aubry A, Vignard V, Godet Y, Khammari A, Dréno B, et al. Double positive CD4CD8 $\alpha\beta$ T cells: a new tumor-reactive population in human melanomas. *PLoS ONE*. 2010; 5(1): e8437.
- Devitt KA, Gardner JA. Intravascular large B-cell lymphoma: the great imitator. *Autops Case Rep*. 2018; 8(4): e2018055.
- Ding Y, Liao W, He XJ, Xiang W. Effects of 1,25(OH)₂D₃ and vitamin D receptor on peripheral CD4⁺/CD8⁺ double-positive T lymphocytes in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *J Cell Mol Med*. 2016; 20(10): 1-11.
- Dlouhy I, Filella X, Rovira J, Magnano L, Rivas-Delgado A, Baumann T, et al. High serum levels of soluble interleukin-2 receptor (sIL2-R), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF) are associated with adverse clinical features and predict poor outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia Res*. 2017; 59: 20-5.
- Długosz-Danecka M, Szmit S, Ogórka T, Skotnicki AB, Jurczak W. The average relative dose intensity of R-CHOP is an independent factor determining favorable overall survival in diffuse large B-cell lymphoma patients. *Cancer Med*. 2019; 8(3): 1103-9.
- Drake MT, Maurer MJ, Link BK, Habermann TM, Ansell SM, Micallef IN, et al. Vitamin D insufficiency and prognosis in non Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2010; 28(27): 4191-8.
- Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2004; 4(1): 11-22.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002; 3(11): 991-8.
- El Gnaoui T, Dupuis J, Belhadj K, Jais JP, Rahmouni A, Copie-Bergman C, et al. Rituximab, gemcitabine and oxaliplatin: an effective salvage regimen for patients with relapsed or refractory B-cell lymphoma not candidates for high-dose therapy. *Ann Oncol*. 2007; 18(8): 1363-68.

- Elahi S, Niki T, Hirashima M, Horton H. Galectin-9 binding to Tim-3 renders activated human CD4+ T cells less susceptible to HIV-1 infection. *Blood*. 2012; 119(18), 4192-204.
- Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009; 6(11): 638-47.
- Essa ES, Tawfeek GAE, El Hassanin SA, Emara KGM. Modulation the expression of natural killer cell activating receptor (NKp44) in the peripheral blood of diffuse large B-cell lymphoma patients and the correlation with clinic pathological features. *Clin Immunol*. 2018; 188: 38-44.
- Felcht M, Heck M, Weiss C, Becker JC, Dippel E, Müller CSL, et al. Expression of the T-cell regulatory marker FOXP3 in primary cutaneous large B-cell lymphoma tumour cells. *Brit J Dermatol*. 2012; 167(2): 348-58.
- Fink EC, Ebert BL. The novel mechanism of lenalidomide activity. *Blood*; 2015; 126(21): 2366-9.
- Fostier K, Caers J, Meuleman N, Broos K, Corthals J, Thielemans K, et al. Impact of lenalidomide maintenance on the immune environment of multiple myeloma patients with low tumor burden after autologous stem cell transplantation. *Oncotarget*. 2018; 9(29): 20476-89.
- Fureau D, Druhan LJ, Steuerwald NM, Baxter SA, Fasan OO, Avalos BR, et al. Cytokine profiling of ABC-subtype and GCB-subtype diffuse large B cell lymphoma: systemic Nfkb activation and impact on myeloid-derived suppressor cells distribution. *Blood*. 2015; 126(23): 2666.
- Friedberg JW. Relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Hemat- Am Soc Hemat*. 2011; 1: 498-505.
- Frydrychowicz M, Boruczkowski M, Kolecka-Bednarczyk A, Dworacki, G. The dual role of Treg in cancer. *Scand J Immunol*. 2017; 86(6): 436-43.
- Fujiki H. Gist of Dr. Katsusaburo Yamagiwa's papers entitled «Experimental study on the pathogenesis of epithelial tumors» (I to VI reports). *Cancer Sci*. 2014; 105(2), 143-9.

- Fujita K, Hayashi T, Matsushita M, Uemura M, Nonomura N. Obesity, inflammation and prostate cancer. *J Clinical Med.* 2019; 8(2), E201.
- Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, Colombo MP, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 2007; 67(1): 425-6.
- Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9(3): 162-74.
- Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol.* 2012; 12(4): 253-68.
- Galdiero MR, Bonavita E, Barajon I, Garlanda C, Mantovani A, Jaillon S. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology.* 2013; 218(11): 1402-10.
- Gatault S, Legrand F, Delbeke M, Loiseau S, Capron M. Involvement of eosinophils in the anti-tumor response. *Cancer Immunol Immun.* 2012; 61(9), 1527-34.
- Geng YD, Chen YR, Jin J, Wang XD, Zhang S, Li DJ. Prognostic Value of D-Dimer in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a retrospective study. *Curr Med Sci.* 2019; 39(2), 222-7.
- Ghesquieres H, Chevrier M, Laadhari M, Chinot O, Choquet S, Moluçon-Chabrot C, et al. Lenalidomide in combination with intravenous rituximab (REVRI) in relapsed/refractory primary CNS lymphoma or primary intraocular lymphoma: a multicenter prospective “proof of concept” phase II study of the French Oculo-Cerebral Lymphoma (LOC) Network and Lymphoma Study Association (LYSA). *Ann Oncol.* 2019; 30(4): 621-8.
- Gini G, Bocci C, Sampaolo M, Trappolini S, Cacciagiù S, Olivieri J, et al. A combination of lenalidomide and rituximab as salvage therapy in elderly patients affected by diffuse large B cells lymphoma relapsed and refractory. *Blood.* 2015; 126: 5109.
- Giovannucci E. The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: a review (United States). *Cancer Causes Control.* 2005; 16(2): 83-95.

- Gisselbrecht C, Van Den Neste E. How I manage patients with relapsed/refractory diffuse large B cell lymphoma. *Brit J Haematol*. 2018; 182(5), 633-43.
- Giulietti A, Gysemans C, Stoffels K, Van Etten E, Decallonne B, Overbergh L, et al. Vitamin D deficiency in early life accelerates type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia*. 2004; 47(3): 451-62.
- Głowała-Kosińska M, Chwieduk A, Nieckula J, Saduś-Wojciechowska M, Grosicki S, Rusin A, et al. Association of circulating regulatory T cell number with the incidence and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol*. 2013; 91(2): 122-8.
- Go S, Park S, Kim JH, Kim HR, Kim M, Moon K, et al. A new prognostic model using the NCCN-IPI and neutrophil-to-lymphocyte ratio in diffuse large B-cell lymphoma. *Tumori*. 2018; 104(4): 292-9.
- Goldmann O, Beineke A, Medina E. Identification of a novel subset of myeloid-derived suppressor cells during chronic staphylococcal infection that resembles immature eosinophils. *J Infect Dis*. 2017; 216(11): 1444-51.
- Gómez-Gélvez JC, Salama ME, Perkins SL, Leavitt M, Inamdar KV. Prognostic impact of tumor microenvironment in diffuse large B-cell lymphoma uniformly treated with R-CHOP chemotherapy. *Am J Clin Pathol*. 2016; 145(4): 514-23.
- Görgün GT, Samur MK, Cowens KB, Paula S, Bianchi G, Anderson JE, et al. Lenalidomide enhances immune checkpoint blockade induced immune response in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2015; 21(20): 4607-18.
- Görgün GT, Whitehill G, Anderson JL, Hideshima T, Maguire C, Laubach J, et al. Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans. *Blood*. 2013; 121(15): 2975-87.
- Goy A, Sinha R, Williams ME, Besisik SK, Drach J, Ramchandren R, et al. Single-agent lenalidomide in patients with mantle-cell lymphoma who

- relapsed or progressed after or were refractory to bortezomib: phase II MCL-001 (EMERGE) study. *J Clin Oncol*. 2013; 31(29): 3688-95.
- Greten TF, Manns MP, Korangy F. Myeloid derived suppressor cells in human diseases. *Int Immunopharmacol*. 2011; 11(7): 802-7.
 - Grimm K, O'Malley D. Aggressive B cell lymphomas in the 2017 revised WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. *Ann Diag Pathol*. 2019; 38: 6-10.
 - Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, 2010; 140(6): 883-99.
 - Guan X, Liu Z, Zhang J, Jin X. Myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma is correlated with CCL2, IL-17 and IL-18 expression in blood and tumors. *Adv Clin Exp Med*. 2018; 27(7): 947-53.
 - Gutiérrez-Domingo A, Gutiérrez-Domingo I, Gallardo-Rodríguez K. Lymphomatoid granulomatosis: a rare tumor with poor prognosis. *Arch Bronconeumol*. 2018;54(2):108-9.
 - Haanen JB, Robert C. Immune-Checkpoint Inhibitors. *Progr Tumor Res*. 2015; 42: 55-66.
 - Han X, Ruan J, Zhang W, Zhou D, Xu D, Pei Q, et al. Prognostic implication of leucocyte subpopulations in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*. 2017; 8(29): 47790-800.
 - Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1): 57-70.
 - Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011; 144(5): 646-74.
 - Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, 2004; 103(1): 275-82.
 - Hao X, Wei Y, Wei X, Zhou L, Wei Q, Zhang Y, et al. Glasgow prognostic score is superior to other inflammation-based scores in predicting survival of diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*, 2017; 8(44): 76740-8.

- Hernández-Ilizaliturri FJ, Deeb G, Zinzani PL, Pileri SA, Malik F, MacOn WR, et al. Higher response to lenalidomide in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma in nongerminal center B-cell-like than in germinal center B-cell-like phenotype. *Cancer*. 2011; 117(22): 5058-66.
- Ho CL, Lu CS, Chen JH, Chen YG, Huang TC, Wu YY. Neutrophil/lymphocyte ratio, lymphocyte/monocyte ratio, and absolute lymphocyte count/absolute monocyte count prognostic score in diffuse large B-cell lymphoma: useful prognostic tools in the rituximab era. *Medicine*. 2015; 94(24): e993.
- Höck AD. Vitamin D3 deficiency results in dysfunctions of immunity with severe fatigue and depression in a variety of diseases. *In Vivo*. 2014; 28(1): 133-45.
- Hohaus S, Tisi MC, Bellesi S, Maiolo E, Alma E, Tartaglia G, et al. Vitamin D deficiency and supplementation in patients with aggressive B-cell lymphomas treated with immunochemotherapy. *Cancer Med*. 2018; 7(1): 270-81.
- Horikawa N, Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, Baba T, Yamaguchi K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer inhibits tumor immunity through the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *Clin Cancer Res*. 2017; 23(2): 587-99.
- Horn H, Ziepert M, Becher C, Barth TF, Bernd HW, Feller AC, et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 2013; 121(12): 2253-63.
- Hossein-nezhad A, Holick MF. Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clin Proc*. 2013; 88(7): 720-55.
- Hou Y, Wang HQ, Ba Y. Rituximab, gemcitabine, cisplatin, and dexamethasone in patients with refractory or relapsed aggressive B-cell lymphoma. *Medical Oncology*, 2012; 29(4), 2409-16.
- Huang W, Medeiros LJ, Lin P, Wang W, Tang G, Khoury J, et al. MYC/BCL2/BCL6 triple hit lymphoma: a study of 33 patients who had an aggressive clinical course similar to patients with double hit lymphomas. *Modern Pathol*, 2018; 31(9):1470-8.

- Iqbal J, Meyer PN, Smith LM, Johnson NA, Vose JM, Greiner TC, et al. BCL2 predicts survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(24), 7785-95.
- Ito K, Okamoto M, Inaguma Y, Okamoto A, Ando M, Ando Y, et al. Influence of R-CHOP therapy on immune system restoration in patients with b-cell lymphoma. *Oncology.* 2016; 91(6): 302-10.
- Ivanov V, Coso D, Chetaille B, Esterni B, Olive D, Aurran-Schleinitz T, et al. Efficacy and safety of lenalinomide combined with rituximab in patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia Lymphoma.* 2014; 55(11): 2508-13.
- Jacobs JF, Nierkens S, Figdor CG, De Vries I, Adema GJ. Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy? *Lancet Oncol.* 2012; 13(1): 32-42.
- Jain P, Fayad LE, Rosenwald A, Young KH, O'Brien S. Recent advances in de novo CD5+ diffuse large B cell lymphoma. *Am J Hematol.* 2013; 88(9): 798-802.
- Jia J, Li W, Zheng Y. Primary cutaneous diffuse large B cell lymphoma- other successfully treated by the combination of R-CHOP chemotherapy and surgery: a case report and review of literature. *Medicine.* 2017; 96(8): e6161.
- Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2012; 12(8), 557-69.
- Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol.* 2012; 30(28): 3452-59.
- Jourdan M, Cren M, Schafer P, Robert N, Duperray C, Vincent L, et al. Differential effects of lenalidomide during plasma cell differentiation. *Oncotarget,* 2016; 7(19): 28096-111.
- Judd J, Dulaimi E, Li T, Millenson MM, Borghaei H, Smith MR, et al. Low level of blood CD4+ T cells is an independent predictor of inferior

- progression-free survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Cl Lymph Myelom Leuk.* 2017; 17(2): 83-8.
- Kallies A. T cell immunosurveillance controls B lymphoma development. *Oncolimmunology.* 2014; 3(4): 29-31.
 - Karakasheva TA, Domínguez GA, Hashimoto A, Lin EW, Chiu C, Sasser K, et al. CD38+ M-MDSC expansion characterizes a subset of advanced colorectal cancer patients. *JCI Insight.* 2018; 3(6): 97022.
 - Karkeni E, Morin SO, Bou Tayeh B, Goubard A, Josselin E, Castellano R, et al. Vitamin D controls tumor growth and CD8+ T cell infiltration in breast cancer. *Front immunol.* 2019; 10: 1-12.
 - Katoh D, Ochi Y, Yabushita T, Ono Y, Hiramoto N, Yoshioka S, et al. Peripheral blood lymphocyte-to-monocyte ratio at relapse predicts outcome for patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Cl Lymph Myelom Leuk.* 2017; 17(12), e91-7.
 - Keam B, Ha H, Kim TM, Jeon YK, Lee SH, Kim DW, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio improves prognostic prediction of International Prognostic Index for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone. *Leukemia Lymphoma,* 2015; 56(7):2032-8.
 - Kelly J, Friedberg J, Calvi L, Van Wijngaarden E, Fisher S. Vitamin D and non-hodgkin lymphoma risk in adults: a review. *Cancer Invest.* 2009; 23(9): 942-51.
 - Khare D, Goldschmidt N, Bardugo A, Gur-Wahnon D, Ben-Dov IZ, Avni B. Plasma microRNA profiling: exploring better biomarkers for lymphoma surveillance. *PLoS ONE.* 2017; 12(11), e0187722.
 - Kim DH, Baek JH, Chae YS, Kim YK., Kim HJ, Park YH, et al. Absolute lymphocyte counts predicts response to chemotherapy and survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia,* 2007; 21(10): 2227-30.
 - Kim JK, Chung JS, Shin HJ, Song MK, Yi JW, Shin DH, et al. Influence of NK cell count on the survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood Res.* 2014; 49(3): 162-9.

- Klanova M, Oestergaard MZ, Trněný M, Hiddermann W, Marcus R, Sehn LH, et al. Prognostic impact of natural killer cell count in follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2019; 25(15): 4634-43.
- Kongsbak M, Levring TB, Geisler C, Von Essen MR. The vitamin D receptor and T cell function. *Front Immunol.* 2013; 4(6): 1-10.
- Kotla V, Goel S, Nischal S, Heuck C, Vivek K, Das B, et al. Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. *J Hematol Oncol.* 2009; 2: 1-10.
- Kubuschok B, Held G, Pfreundschuh M. Management of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Cancer Treat Res.* 2015; 165: 271-88.
- Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T cell development, localization, and function throughout life. *Immunity.* 2018; 48(2), 202-13.
- Kumar BV, Patel S, Tcyganov E, Gabrilovich DI. The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Trends Immunol.* 2016; 37(3), 208-20.
- Kunder C, Cascio MJ, Bakke A, Venkataraman G, O'Malley DP, Ohgami RS. Predominance of CD4+ T cells in T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma and identification of a subset of patients with peripheral B-cell lymphopenia. *Am J Clin Pathol.* 2017; 147(6): 596-603.
- Kusano Y, Yokoyama M, Terui Y, Nishimura N, Mishima Y, Ueda K, et al. Low absolute peripheral blood CD4+ T-cell count predicts poor prognosis in R-CHOP-treated patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Cancer J.* 2017; 7(4): e558.
- Lagrue K, Carisey A, Morgan DJ, Chopra R, Davis DM. Lenalidomide augments actin remodeling and lowers NK-cell activation thresholds. *Blood.* 2015; 126(1): 50-60.
- Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res.* 2014; 2014:149185.
- Lee BN, Gao H, Cohen EN, Badoux X, Wierda WG, Estrov Z, et al. Treatment with lenalidomide modulates T-cell immunophenotype and

- cytokine production in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 2011; 117(17); 3999-4008.
- Lee NR, Song EK, Jang KY, Choi HN, Moon WS, Kwon K, et al. Prognostic impact of tumor infiltrating FOXP3 positive regulatory T cells in diffuse large B-cell lymphoma at diagnosis. *Leukemia Lymphoma*, 2008; 49(2): 247-56.
 - Lee SE, Lim JY, Ryu DB, Kim TW, Yoon JH, Cho BS, et al. Circulating immune cell phenotype can predict the outcome of lenalidomide plus low-dose dexamethasone treatment in patients with refractory/relapsed multiple myeloma. *Cancer Immunol Immunother*. 2016; 65(8): 983-94.
 - Li S, Young KH, Medeiros L. Diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology*. 2018;50(1):74-87.
 - Lin Y, Gustafson MP, Bulur PA, Gastineau DA, Witzig TE, Dietz AB. Immunosuppressive CD14+HLA-DR low/- monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2011; 117(3): 872-82.
 - Liu D, Ahmet A, Ward L, Krishnamoorthy P, Mandelcorn ED, Leigh R, et al. A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy. *Allergy Asthma Cl Im*. 2013; 9(1): 30.
 - Liu Q, Zhang C, Sun A, Zheng Y, Wang L, Cao X. Tumor-educated CD11b^{high} Ia^{low} regulatory dendritic cells suppress T cell response through arginase I. *J Immunol*. 2009; 182(10): 6207-16.
 - Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*. 2006; 203(7): 1701-11.
 - Liu WC, Zheng CM, Lu CL, Lin YF, Shyu JF, Wu CC, et al. Vitamin D and immune function in chronic kidney disease. *Clin Chim Acta*. 2015; 450: 135-44.
 - López-Relaño J, Martín-Adrados B, Real-Arévalo I, Lozano-Bartolomé J, Abós B, Sánchez-Ramón S, et al. Monocyte-derived dendritic cells differentiated in the presence of lenalidomide display a semi-mature

- phenotype, enhanced phagocytic capacity, and Th1 polarization capability. *Front Immunol.* 2018; 9(6): 1-14.
- López-Santillán M, Larrabeiti-Etxebarria A, Arzuaga-Méndez J, López-López E, García-Orad A. Circulating miRNAs as biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a systematic review. *Oncotarget.* 2018; 9(32): 22850-61.
 - López A, Gutiérrez A, Palacios A, Blancas I, Navarrete M, Morey M, et al. GEMOX-R regimen is a highly effective salvage regimen in patients with refractory/relapsing diffuse large-cell lymphoma: a phase II study. *Eur J Haematol.* 2007;80(2),127-32.
 - Lu D, Chen J, Jin J. Vitamin D status and risk of non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis. *Cancer Cause Control.* 2014; 25(11): 1553-63.
 - Lu LC, Chang CJ, Hsu CH. Targeting myeloid-derived suppressor cells in the treatment of hepatocellular carcinoma: current state and future perspectives. *J Hepatocell Carcinoma.* 2019; 6: 71-84.
 - Lu M, Taylor BV, Körner H. Genomic effects of the vitamin D receptor: potentially the link between vitamin D, immune cells, and multiple sclerosis. *Front Immunol.* 2018; 9: 477.
 - Lykken JM, Tedder TF. The tumor microenvironment regulates CD19 and CD20 immunotherapy for lymphoma. *Cancer J.* 2015; 21(4): 351-6.
 - Lysandropoulos AP, Jaquiéry E, Jilek S, Pantaleo G, Schluep M, Du Pasquier RA. Vitamin D has a direct immunomodulatory effect on CD8+ T cells of patients with early multiple sclerosis and healthy control subjects. *J Neuroimmunol.* 2011; 233(1-2); 240-4.
 - Ma H, Xia CQ. Phenotypic and functional diversities of myeloid-derived suppressor cells in autoimmune diseases. *Mediat Inflamm.* 2018; 2018: 4316584.
 - Macchi B, Graziani G, Zhang J, Mastino A. Emergence of double-positive CD4/CD8 cells from adult peripheral blood mononuclear cells infected with human T cell leukemia virus type I (HTLV-I). *Cell Immunol.* 1993; 149: 376-89.

- Manfroi B, Moreaux J, Righini C, Ghiringhelli F, Sturm N, Huard B. Tumor-associated neutrophils correlate with poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients. *Blood Cancer J.* 2018; 8(7): 8-11.
- Marangon M, Stefoni V, Castellino A, Visco C, Tani M, Cox MC, et al. Lenalidomide combination therapy in relapsed/refractory diffuse large B cell lymphoma: the Italian real-life experience. *Clin Lymph Myelom and Leuk.* 2019; 19(7): e321-e323.
- Marinho A, Carvalho C, Boleixa D, Bettencourt A, Leal B, Guimarães J, et al. Vitamin D supplementation effects on FoxP3 expression in T cells and FoxP3+/IL-17A ratio and clinical course in systemic lupus erythematosus patients: a study in a Portuguese cohort. *Immunol Res.* 2017; 65(1): 197-206.
- Martelli M, Ferreri A, Di Rocco A, Ansuinelli M, Johnson PWM. Primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hemat.* 2017; 113: 318-27.
- Martín A, Redondo AM, Dlouhy I, Salar A, González-Barca E, Canales M, et al. Lenalidomide in combination with R-ESHAP in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma: a phase 1b study from GELTAMO group. *Brit J Haematol.* 2016; 173(2): 245-52.
- Martin P, Jung SH, Pitcher B, Bartlett NL, Blum KA, Shea T, et al. A phase II trial of lenalidomide plus rituximab in previously untreated follicular non-Hodgkin's lymphoma (NHL): CALGB 50803 (Alliance). *Ann Oncol.* 2017; 28(11), 2806-12.
- Martineau AR, Timms PM, Bothamley GH, Hanifa Y, Islam K, Claxton AP, et al. High-dose vitamin D3 during intensive phase treatment of pulmonary tuberculosis: a double-blind randomised controlled trial. *Lancet.* 2011; 377(9761), 242-50.
- Martiniani R, Di Loreto V, Di Sano C, Lombardo A, Liberati AM. Biological activity of lenalidomide and its underlying therapeutic effects in multiple myeloma. *Adv Hematol.* 2012; 2012: 842945.
- Masir N, Akhter A, Roshan TM, Florence CS, Abdul-Rahman F, Tumian NR, et al. Diffuse large B-cell lymphoma in Southeast Asian cohort:

- expression patterns of B-cell receptor (BCR) repertoire and its linkage with molecular subtypes and response to R-CHOP therapy. *J Clin Pathol.* 2019; 72(9): 630-5.
- Menard C, Dulong J, Nguyen TT, Bescher N, Latour M, Bézier I, et al. Lenalidomide treatment restores in vivo T cell activity in relapsed/refractory FL and DLBCL. *Blood.* 2017; 130: 729.
 - Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol.* 2011; 29(2): 200-7.
 - Millrud CR, Bergenfelz C, Leandersson K. (2017). On the origin of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget,* 2017; 8(2): 3649-65.
 - Mitobe M, Kawamoto K, Suzuki T, Kiryu M, Tamura S, Nanba A, et al. Gemcitabine, dexamethasone, and cisplatin regimen as an effective salvage therapy for high-grade B-cell lymphoma with *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* rearrangements. *Internal Med.* 2019; 58(4): 575-80.
 - Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases - elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol.* 2014; 27: 16-25.
 - Moccia AA, Hitz F, Hoskins P, Klasa R, Power MM, Savage KJ, et al. Gemcitabine, dexamethasone, and cisplatin (GDP) is an effective and well-tolerated salvage therapy for relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Leukemia Lymphoma.* 2016; 58(2): 324-32.
 - Mohd I, Gajbhiye SS, Verma R, Sardhara J. Solitary primary central nervous system plasmablastic lymphoma in a young immunocompetent female: report on an extremely rare entity with review of literature. *Asian J Neurosurg.* 2019;14(2): 541-6.
 - Mondello P, Steiner N, Willenbacher W, Ferrero S, Ghione P, Marabese A, et al. Lenalidomide in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma: is it a valid treatment option? *Oncologist.* 2016; 21(9): 1107-12.

- Mondul AM, Weinstein SJ, Layne TM, Albanes D. Vitamin D and cancer risk and mortality: state of the science, gaps, and challenges. *Epidemiol Rev.* 2017; 39(1): 28-48.
- Movahedi K, Guillems M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Beschin A, De Baetselier P, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood*, 2008; 111(8):4233-44.
- Nakayama S, Yokote T, Akioka T, Hiraoka N, Nishiwaki U, Miyoshi T, et al. Infiltration of effector regulatory T cells predicts poor prognosis of diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. *Blood adv.* 2017; 1(8): 486-93.
- Nam SJ, Kim S, Kwon D, Kim H, Kim S, Lee E, et al. Prognostic implications of tumor-infiltrating macrophages, M2 macrophages, regulatory T-cells, and indoleamine 2,3-dioxygenase-positive cells in primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. *Oncol Immunology.* 2018; 7(7): e1442164.
- Nascimbeni M, Shin E, Chiriboga L, Kleiner DE, Rehermann B. Peripheral CD4/CD8 double-positive T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood.* 2004; 104(2): 478-87.
- Nguyen-Pham TN, Jung SH, Vo MC, Thanh-Tran HT, Lee YK, Lee HJ, et al. Lenalidomide synergistically enhances the effect of dendritic cell vaccination in a model of murine multiple myeloma. *J Immunother.* 2015; 38(8): 330-9.
- Nowakowski GS, LaPlant B, Macon WR, Reeder CB, Foran JM, Nelson GD, et al. Lenalidomide combined with R-CHOP overcomes negative prognostic impact of non-germinal center B-cell phenotype in newly diagnosed diffuse large B-cell lymphoma: a phase II study. *J Clin Oncol.* 2015; 33(3): 251-7.
- Ochando J, Conde P, Utrero-Rico A, Paz-Artal E. Tolerogenic role of myeloid suppressor cells in organ transplantation. *Front Immunol.* 2019; 10: 374.
- Oki Y, Yamamoto K, Kato H, Kuwatsuka Y, Taji H, Kagami Y, et al. Low

- absolute lymphocyte count is a poor prognostic marker in patients with diffuse large B-cell lymphoma and suggests patients' survival benefit from rituximab. *Eur J Haematol*. 2008; 81(6): 448-53.
- Ophir E, Bobisse S, Coukos G, Harari A, Kandalafi LE. Personalized approaches to active immunotherapy in cancer. *BBA-Rev Cancer*. 2016; 1865(1): 72-82.
 - Ott G, Ziepert M, Klapper W, Horn H, Szczepanski M, Bernd HW, et al. Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the DSHNHL. *Blood*. 2010; 116(23), 4916-25.
 - Overgaard NH, Jung JW, Steptoe RJ, Wells JW. CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J Leukocyte Biol*. 2015; 97(1): 31-8.
 - Padoan A, Plebani M, Basso D. Inflammation and pancreatic cancer: focus on metabolism, cytokines, and immunity. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(3): E676.
 - Pan Z, Hu S, Li M, Zhou Y, Kim YS, Reddy V, et al. ALK-positive large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 26 cases with review of additional 108 cases in the literature. *Am J Surg Pathol*. 2017; 41(1): 25-38.
 - Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12(4): 252-64.
 - Park R, Winnicki M, Liu E, Chu WM. Immune checkpoints and cancer in the immunogenomics era. *Brief Funct Genomics*. 2019; 18(2): 133-9.
 - Pérez-Pérez A, Sánchez-Jiménez F, Vilariño-García T, De La Cruz L, Virizuela JA, Sánchez-Margalet V. Sam68 mediates the activation of insulin and leptin signalling in breast cancer cells. *PLoS ONE*. 2016; 11(7): e0158218.
 - Péricart S, Tosolini M, Gravelle P, Rossi C, Traverse-Glehen A, Amara N, et al. Profiling immune escape in hodgkin's and diffuse large b-cell lymphomas using the transcriptome and immunostaining. *Cancers*. 2018;

10(11): 1-17.

- Perry AM, Mitrovic Z, Chan WC. Biological prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Control*. 2012; 19(3): 214-26.
- Pianko MJ, Liu Y, Bagchi S, Lesokhin AM. Immune checkpoint blockade for hematologic malignancies: a review. *Stem Cell Investig*. 2017; 4: 32.
- Plitas G, Rudenksky AY. Regulatory T cells: differentiation and function. *Cancer Immunol Res*. 2016; 4(9), 721-5.
- Poon AH, Mahboub B, Hamid Q. Vitamin D deficiency and severe asthma. *Pharmacol Therapeut*. 2013; 140(2): 148-55.
- Porrata LF, Ristow K, Habermann T, Inwards DJ, Micallef IN, Markovic SN. Predicting survival for diffuse large B-cell lymphoma patients using baseline neutrophil/lymphocyte ratio. *Am J Hematol*. 2010; 85(11): 896-9.
- Porrata LF, Ristow K, Habermann TM, Ozsan N, Dogan A, MacOn W, et al. Absolute monocyte/lymphocyte count prognostic score is independent of immunohistochemically determined cell of origin in predicting survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia Lymphoma*. 2012; 53(11), 2159-65.
- Preston CC, Maurer MJ, Oberg AL, Visscher DW, Kalli KR, Hartmann LC, et al. The ratios of CD8+ T cells to CD4+CD25+ FOXP3+ and FOXP3- T cells correlate with poor clinical outcome in human serous ovarian cancer. *PLoS ONE*, 2013; 8(11): 1-10.
- Quan L, Chen X, Liu A, Zhang Y, Guo X, Yan S, et al. PD-1 Blockade can restore functions of tcells in Epstein-Barr virus-positive diffuse large b-cell lymphoma in vitro. *PLoS ONE*, 2015; 10(9): 1-19.
- Rahemtullah A, Reichard KK, Preffer FI, Harris NL, Hasserjian RP. A double-positive CD4+CD8+ T-cell population is commonly found in nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2006; 126(5): 805-14.
- Rajnai H, Heyning FH, Koens L, Sebestyén A, Andrikovics H, Hogendoorn PCW, et al. The density of CD8+ T-cell infiltration and expression of BCL2 predicts outcome of primary diffuse large B-cell

- lymphoma of bone. *Virchows Archiv*. 2014; 464(2): 229-39.
- Ramos RN, Moraes CJ, Zelante B, Barbuto JA. What are the molecules involved in regulatory T-cells induction by dendritic cells in cancer? *Clin Dev Immunol*. 2013; 2013: 806025.
 - Rao T, Tan Z, Peng J, Guo Y, Chen Y, Zhou H, et al. The pharmacogenetics of natural products: a pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. *Pharmacol Res*. 2019; 146: 104283.
 - Rimsza L, Roberts R, Miller T, Unger J, LeBlanc M, Braziel R, et al. Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival: a follow-up study to the NIH director's challenge leukemia and lymphoma molecular profiling project. *Blood*. 2004;103(11): 4251-8.
 - Ritterhouse LL, Lu R, Shah HB, Robertson JM, Fife DA, Maecker HT, et al. Vitamin D deficiency in a multiethnic healthy control cohort and altered immune response in vitamin D deficient European-American healthy controls. *PLoS ONE*, 2014; 9(4): 1-13.
 - Rodríguez PC, Ernstoff MS, Hernández C, Atkins M, Zabaleta J, Sierra R et al. Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res*. 2009; 69(4): 1553-60.
 - Romano A, Parrinello NL, La Cava P, Tibullo D, Giallongo C, Camiolo G, et al. PMN-MDSC and arginase are increased in myeloma and may contribute to resistance to therapy. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018; 18(7): 675-83.
 - Rose DP, Vona-Davis L. The cellular and molecular mechanisms by which insulin influences breast cancer risk and progression. *Endocr Relat Cancer*. 2012; 19(6): R225-41.
 - Ruttinger D, Winter H, Van den Engel NK, Hatz R, Jauch KW, Fox BA, et al. Immunotherapy of cancer: key findings and commentary on the Third Tegernsee Conference. *Oncologist*. 2010; 15(1): 112-8.
 - Safarzadeh E, Orangi M, Mohammadi H, Babaie F, Baradaran B. Myeloid-derived suppressor cells: important contributors to tumor

- progression and metastasis. *J Cell Physiol.* 2018; 233(4): 3024-36.
- Sakamaki I, Kwak LW, Cha S, Yi Q, Lerman B, Chen J, et al. Lenalidomide enhances the curative effect of a therapeutic vaccine and reverses immune suppression in mice bearing established lymphomas. *Leukemia.* 2014; 28(2): 329-37.
 - Sakkal S, Miller S, Apostolopoulos V, Nurgali K. Eosinophils in cancer: favourable or unfavourable? *Curr Med Chem.* 2016; 23(7): 650-66.
 - Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Immunosenescence: the potential role of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in age-related immune deficiency. *Cell Mol Life Sci.* 2019; 76(10): 1901-18.
 - Sánchez-Margalet V, Barco-Sánchez A, Vilariño-García T, Jiménez-Cortegana C, Pérez-Pérez A, Henao-Carrasco F, et al. Circulating regulatory T cells from breast cancer patients in response to neoadjuvant chemotherapy. *Transl Cancer Res.* 2019;8(1):59-65.
 - Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 2011; 331(6024): 1565-70.
 - Schrijver IT, Théroutte C, Roger T. Myeloid-derived suppressor cells in sepsis. *Front Immunol.* 2019; 10: 327.
 - Schuhmacher B, Rengstl B, Döring C, Bein J, Newrzela S, Brunnberg U, et al. A strong host response and lack of MYC expression are characteristic for diffuse large B cell lymphoma transformed from nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *Oncotarget.* 2016; 7(44): 72197-210.
 - Scott GB, Carter C, Parrish C, Wood PM, Cook G. Downregulation of myeloma-induced ICOS-L and regulatory T cell generation by lenalidomide and dexamethasone therapy. *Cell Immunol.* 2015; 297(1): 1-9.
 - Sehn L.H, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P. The revised International Prognostic Index is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with DLBCL treated with R-CHOP. *Blood,* 2007; 109(5), 1857-61.

- Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood*. 2015; 125(1): 22-32.
- Shaul ME, Fridlender ZG. Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019; 16(10): 601-20.
- Shen QD, Zhu HY, Wang L, Fan L, Liang JH, Cao L, et al. Gemcitabine-oxaliplatin plus rituximab (R-GemOx) as first-line treatment in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a single-arm, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Haematol*, 2018; 5(6): e261-9.
- Shou D, Wen L, Song Z, Yin J, Sun Q, Gong W. Suppressive role of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in the microenvironment of breast cancer and targeted immunotherapies. *Oncotarget*. 2016; 7(39): 64505-11.
- Siddiqui M, Ristow K, Markovic SN, Witzig TE, Habermann TM, Colgan JP, et al. Absolute lymphocyte count predicts overall survival in follicular lymphomas. *Brit J Haematol*. 2006; 134(6): 596-601.
- Skrobot A, Demkow U, Wachowska M. Immunomodulatory role of vitamin D: a review. *Adv Exp Med Biol*. 2018; 1108: 13-23.
- Solans M, Fàbrega A, Morea D, Auñon-Sanz C, Granada I, Roncero JM, et al. Population-based incidence of lymphoid neoplasms: twenty years of epidemiological data in the Girona province, Spain. *Cancer Epidemiol*. 2019; 58: 8-11.
- Song MK, Chung JS, Seol YM, Kim SG, Shin HJ, Choi YJ, et al. Influence of low absolute lymphocyte count of patients with nongerminal center type diffuse large B-cell lymphoma with R-CHOP therapy. *Ann Oncol*. 2009; 21(1): 140-4.
- Steele KE, Tan TH, Korn R, Dacosta K, Brown C, Kuziora M, et al. Measuring multiple parameters of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in human cancers by image analysis. *J Immunother Cancer*. 2018. 6(1): 20
- Strati P, Takahashi K, Peterson CB, Keating MJ, Thompson PA, Daver NG, et al. Efficacy and predictors of response of lenalidomide and rituximab in patients with treatment-naive and relapsed CLL. *Blood Adv*.

- 2019; 3(9): 1533-9.
- Sun F, Zhu J, Lu S, Zhen Z, Wang J, Huang J, et al. An inflammation-based cumulative prognostic score system in patients with diffuse large B cell lymphoma in rituximab era. *BMC Cancer*. 2018; 18: 5.
 - Sunshine J, Taube JM. PD-1/PD-L1 inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*. 2015; 23: 32-8.
 - Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016; 127(20): 2375-90.
 - Szymczak I, Pawliczak R. The active metabolite of vitamin D3 as a potential immunomodulator. *Scand J Immunol*. 2016; 83(2): 83-91.
 - Tabatabaeizadeh SA, Avan A, Bahrami A, Khodashenas E, Esmaeili H, Ferns GA, et al. High dose supplementation of vitamin D affects measures of systemic inflammation: reductions in high sensitivity C-Reactive Protein level and neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) distribution. *J Cell Biochem*. 2017; 118(12): 4317-22.
 - Tadmor T, Bari A, Sacchi S, Marcheselli L, Liardo EV, Avivi I, et al. Monocyte count at diagnosis is a prognostic parameter in diffuse large B-cell lymphoma: results from a large multicenter study involving 1191 patients in the pre- and post-rituximab era. *Haematologica*. 2014; 99(1): 125-30.
 - Tadmor T, Fell R, Polliack A, Attias D. Absolute monocytosis at diagnosis correlates with survival in diffuse large B-cell lymphoma-possible link with monocytic myeloid-derived suppressor cells. *Hematol Oncol*. 2012; 31(2): 325-31.
 - Takada K, Kashiwagi S, Goto W, Asano Y, Takahashi K, Takashima T, et al. Use of the tumor-infiltrating CD8 to FOXP3 lymphocyte ratio in predicting treatment responses to combination therapy with pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for advanced HER2-positive breast cancer. *J Transl Med*. 2018; 16(1): 86.
 - Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010; 40(6): 805-20.

- Teras LR, DeSantis CE, Cerhan JR, Morton LM, Jemal A, Flowers CR. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes. *CA Cancer J Clin.* 2016; 66(6): 443-59.
- Thakral B, Medeiros LJ, Desai P, Lin P, Yin CC, Tang G, et al. Prognostic impact of CD5 expression in diffuse large B-cell lymphoma in patients treated with rituximab-EPOCH. *Eur J Haematol.* 2017; 98(4): 415-21.
- Thomas L. On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med.* 1982; 55(3-4), 329-33.
- Tilly H, Vitolo U, Walewski J, Da Silva MG, Shpilberg O, André M, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2012; 23(suppl. 7): 78-82.
- Togashi Y, Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression - implications for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019; 16(6): 356-71.
- Trněný M, Lamy T, Walewski J, Belada D, Mayer J, Radford J, et al. Lenalidomide versus investigator's choice in relapsed or refractory mantle cell lymphoma (MCL-002; SPRINT): a phase 2, randomised, multicentre trial. *Lancet Oncol.* 2016; 17(3): 319-31.
- Turki AT, Lamm W, Liebrechts T, Dührsen U. R-ICE chemotherapy with or without autologous transplantation for elderly patients with relapsed or refractory aggressive B-cell lymphomas. *Oncol Res Treat.* 2018; 41(9): 534-8.
- Tuscano JM, Dutia M, Chee K, Brunson A, Reed-Pease C, Abedi M, et al. Lenalidomide plus rituximab can produce durable clinical responses in patients with relapsed or refractory, indolent non-Hodgkin lymphoma. *Brit J Haematol.* 2014; 165(3): 375-81.
- Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, Went P, Pileri SA, Dirnhofer S. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica.* 2008; 93(2): 193-200.

- Uhel F, Azzaoui I, Grégoire M, Pangault C, Dulong J, Tadié JM, et al. Early expansion of circulating granulocytic myeloid-derived suppressor cells predicts development of nosocomial infections in patients with sepsis. *Am J Resp Crit Care*. 2017; 196(3):315-27.
- Uribe-Querol E, Rosales C. Neutrophils in cancer: two sides of the same coin. *J Immunol Res*. 2015; 2015(6): 1-21.
- Vaidya R, Witzig TE. Prognostic factors for diffuse large B-cell lymphoma in the R(X)CHOP era. *Ann Oncol*. 2014; 25(11): 2124-33.
- Van Dijck R, Janssens A, Dierickx D, Delforge M, Gheysens O, Tousseyn T, et al. Blinatumomab in relapsed/refractory diffuse large B cell lymphoma. *Ann Hematol*. 2017; 96(10): 1759-62.
- Varricchi G, Galdiero MR, Loffredo S, Marone G, Iannone R, Marone G, et al. Are mast cells MASTers in cancer? *Front Immunol*. 2017; 8:424.
- Varricchi G, Loffredo S, Galdiero MR, Marone G, Cristinziano L, Granata F, et al. Innate effector cells in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Curr Opin Immunol*. 2018; 53: 152-60.
- Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari MC, Moretta L. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur J Immunol*. 2014; 44(6): 1582-92.
- Vo D, Alexia C, Allende-Vega N, Morschhauser F, Houot R, Menarde C, et al. NK cell activation and recovery of NK cell subsets in lymphoma patients after obinutuzumab and lenalidomide treatment. *Oncol Immunology*. 2018; 7(4): 1-11.
- Vo MC, Anh-NguyenThi T, Lee HJ, Nguyen-Pham TN, Jaya Lakshmi T, Jung SH, et al. Lenalidomide enhances the function of dendritic cells generated from patients with multiple myeloma. *Exp Hematol*. 2017; 46: 48-55.
- Vo MC, Nguyen-Pham TN, Lee HJ, Lakshmi TJ, Yang S, Jung SH, et al. Combination therapy with dendritic cells and lenalidomide is an effective approach to enhance antitumor immunity in a mouse colon cancer model. *Oncotarget*, 2017; 8(16): 27252-62.
- Wang JJ, Dong M, He XH, Li YX, Wang WH, Liu P, et al. GDP

- (gemcitabine, dexamethasone, and cisplatin) is highly effective and well-tolerated for newly diagnosed stage IV and relapsed/refractory extranodal Natural Killer/T-cell lymphoma, nasal type. *Medicine*. 2016; 95(6): e2787.
- Wang J, Zhou M, Xu JY, Yang YG, Zhang QG, Zhou RF, et al. Prognostic role of pretreatment neutrophillymphocyte ratio in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with RCHOP. *Medicine*. 2016; 95(38): e4893.
 - Wang J, Gao K, Lei W, Dong L, Xuan Q, Feng M, et al. Lymphocyte-to-monocyte ratio is associated with prognosis of diffuse large B-cell lymphoma: correlation with CD163 positive M2 type tumor-associated macrophages, not PD-1 positive tumor-infiltrating lymphocytes. *Oncotarget*, 2017; 8(3): 5414-25.
 - Wang M, Fowler N, Wagner-Bartak N, Feng L, Romaguera J, Neelapu SS, et al. Oral lenalidomide with rituximab in relapsed or refractory diffuse large cell, follicular and transformed lymphoma: a phase II clinical trial. *Leukemia*. 2013;27(9):1902-9.
 - Wang M, Fayad L, Wagner-Bartak N, Zhang L, Hagemester F, Neelapu SS, et al. Lenalidomide in combination with rituximab for patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: a phase 1/2 clinical trial. *Lancet Oncol*. 2012; 13(7):716-23.
 - Wang S, Ma Y, Sun L, Shi Y, Jiang S, Yu K, et al. Prognostic significance of pretreatment neutrophil/lymphocyte ratio and platelet/lymphocyte ratio in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *BioMed Res Int*. 2018; 2018: 9651254.
 - Wang WG, Jiang XN, Liu ZB, Zhou XY, Li XQ. MYC protein-positive diffuse large B-cell lymphoma features an activated B-cell receptor signal pathway. *Am J Surg Pathol*. 2017; 41(4): 541-9.
 - Wang Y, Wagner-Bartak N, Zhou S, Fowler N, De la Rosa ML, Zhao D, et al. Lenalidomide plus rituximab for relapsed or refractory diffuse large B-cell, follicular and transformed lymphoma: final data analysis of a phase 2 trial. *Blood*. 2015; 126: 3969.
 - Webb ES, Liu P, Baleeiro R, Lemoine NR, Yuan M, Wang Y. Immune

- checkpoint inhibitors in cancer therapy. *J Biomed Res.* 2018; 32(5): 317-26.
- Weber JS, Dummer R, De Pril V, Lebbé C, Hodi FS. Patterns of onset and resolution of immune-related adverse events of special interest with ipilimumab: detailed safety analysis from a phase 3 trial in patients with advanced melanoma. *Cancer.* 2013; 119(9): 1675-82.
 - Weng Q, Wang J, Wang J, Wang J, Sattar F, Zhang Z, et al. Lenalidomide regulates CNS autoimmunity by promoting M2 macrophages polarization article. *Cell Death Dis.* 2018; 9(2): 251.
 - Wu C, Wu X, Liu X, Yang P, Xu J, Chai Y, et al. Prognostic significance of monocytes and monocytic myeloid-derived suppressor cells in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Cell Physiol Biochem.* 2016; 39(2): 521-30.
 - Wu C, Wu X, Zhang X, Chai Y, Guo Q, Li L, et al. Prognostic significance of peripheral monocytic myeloid-derived suppressor cells and monocytes in patients newly diagnosed with diffuse large b-cell lymphoma. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8(9): 15173-81.
 - Xie Y, Pittaluga S, Jaffe ES. The histological classification of diffuse large B-cell lymphomas. *Semin Hematol.* 2015; 52(2): 57-66.
 - Xie Z, Zhang Y, Jin C, Fu D. Gemcitabine-based chemotherapy as a viable option for treatment of advanced breast cancer patients: a meta-analysis and literature review. *Oncotarget.* 2018; 9(6), 7148-61.
 - Xu Y, Kroft SH, McKenna RW, Aquino DB. Prognostic significance of tumour-infiltrating T lymphocytes and T-cell subsets in de novo diffuse large B-cell lymphoma: a multiparameter flow cytometry study. *Br J Haematol.* 2001; 112(4): 945-9.
 - Yang Z, Yu W, Wang S, Zhou X, Liu S, Ma S. Peripheral blood lymphocyte subsets of newly diagnosed DLBCL patients and their dynamic changes with rituximab based immunochemotherapy. *Leuk Lymphoma.* 2019; 60(12): 2909-16.
 - Yin LL, Wen XM, Lai QH, Li J, Wang XW. Lenalidomide improvement of cisplatin antitumor efficacy on triple-negative breast cancer cells in vitro.

- Oncol Lett.* 2018; 15(5): 6469-74.
- Yin Q, Chen L, Li Q, Mi R, Li Y, Wei X, et al. Changes of T-lymphocyte subpopulation and differential expression pattern of the T-bet and GATA-3 genes in diffuse large B-cell lymphoma patients after chemotherapy. *Cancer Cell Int.* 2014; 14(1): 1-11.
 - Young MRI, Xiong Y. Influence of vitamin D on cancer risk and treatment: why the variability? *Trends Cancer Res.* 2018; 13: 43-53.
 - Zamarron BF, Chen W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int J Biol Sci.* 2011; 7(5): 651–8.
 - Zhang Y, Wang X, Liu Y, Sun C, Shi W, Huang H. Lenalidomide combined with R-GDP in a patient with refractory CD5-positive diffuse large B-cell lymphoma: a promising response and review. *Cancer Biol Ther.* 2018; 19(7): 549-53.
 - Zhang Y, Gallastegui N, Rosenblatt JD. Regulatory B cells in anti-tumor immunity. *Int Immunol.* 2015; 27(10): 521-530.
 - Zhao M, Duan XH, Wu ZZ, Gao CC, Wang N, Zheng ZH. Severe vitamin D deficiency affects the expression of autophagy related genes in PBMCs and T-cell subsets in active systemic lupus erythematosus. *Am J Clin Exp Immunol.* 2017; 6(4): 43-51.
 - Zhao P, Zang L, Zhang X, Chen Y, Yang H, Zhao H, et al. The lymphocyte–monocyte ratio and the platelet–lymphocyte ratio at diagnosis as independent prognostic factors in primary gastrointestinal diffuse large B cell lymphoma. *Indian J Hematol Blo.* 2017; 33(3): 333-41.
 - Zheng SM, Zhou DJ, Chen YH, Jiang R, Wang YX, Zhang Y, et al. Pancreatic T/histiocyte-rich large B-cell lymphoma: a case report and review of literature. *World J Gastroentero.* 2017; 23(24): 4467-72.
 - Zhou SJ, Ma YY, Zhang Y, Luo S, Tang LY, Chen Y, et al. Peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio following completion of first-line therapy predicts early relapse in patients with diffuse large B cell lymphoma. *Ann Hematol.* 2017; 96(2):237-43.
 - Zhou S, Xu L, Ma Y, Tang L, Zhang Y, Shi Y, et al. Peripheral blood lymphocyte to monocyte ratio recovery from low levels at diagnosis after

- completion of first line therapy predicts good clinical outcomes in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*, 2017; 8(12), 19556-65.
- Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol*. 2010; 28(1): 445-89.
 - Zoso A, Mazza EM, Biciato S, Mandruzzato S, Bronte V, Serafini P, et al. Human fibrocytic myeloid-derived suppressor cells express IDO and promote tolerance via Treg-cell expansion. *Eur J Immunol*. 2014; 44(11): 3307-19.

Anexos

Anexo I. Dictamen del Comité Ético

JUNTA DE ANDALUCÍA

CONSEJERÍA DE IGUALDAD, SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES
Dirección General de Calidad, Investigación, Desarrollo e Innovación
Comité Coordinador de Ética de la Investigación Biomédica de Andalucía

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN

ANTONIO VELÁZQUEZ MARTÍNEZ COMO SECRETARIO/A DEL COMITÉ COORDINADOR DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE ANDALUCÍA

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor GOTEL. Grupo Oncológico para el Tratamiento y Estudio de los Linfomas al Ensayo Clínico con código de protocolo del promotor R2-GDP-GOTEL y número de EudraCT 2014-001620-29 titulado:

Ensayo fase II para valorar la combinación de Lenalidomida con R-GDP (R2-GDP) en pacientes con linfoma difuso de células grandes B refractarios o en recaída (R/R LDCGB) no candidatos a quimioterapia a altas dosis y trasplante de células progenitoras hematopoyéticas

Protocolo Versión 1.1 de 08 de septiembre de 2014

HIPyCI GOTEL V1.1 de 08 de septiembre de 2014

y considera que:

El ensayo se plantea siguiendo los requisitos del Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero y las normas que le son de aplicación y su realización es pertinente.

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.

El seguro o la garantía financiera previstos son adecuados.

El procedimiento para obtener el consentimiento informado y el plan de reclutamiento de sujetos previstos son adecuados, así como las compensaciones previstas para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el ensayo.

La capacidad del investigador/a y sus colaboradores y las instalaciones y medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.


El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Por tanto, actuando como comité de referencia, y habiendo tenido en cuenta las aportaciones de los CEICs implicados, acepta que dicho ensayo clínico sea realizado en los centros siguientes por los investigadores/as principales que se relacionan a continuación:

Centro	Investigador/a	CEIC
HOSPITAL COSTA DEL SOL	Antonio Rueda Dominguez	CEI Área Costa del Sol



Código Seguro De Verificación:	H36S1YqxZJCg1hrUhbX5HA==	Fecha	16/10/2014
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.		
Firmado Por	Antonio Velazquez Martinez		
Url De Verificación	https://ws058.juntadeandalucia.es/verifirma/code/H36S1YqxZJCg1hrUhbX5HA=	Página	1/3



COMPLEJO HOSPITALARIO REGIONAL VIRGEN MACARENA	Luis de la Cruz Merino	CEI Hospital Universitario Virgen Macarena
COMPLEJO HOSPITALARIO REGIONAL VIRGEN DEL ROCIO	Fátima de la Cruz Vicente	CEI Hospital Universitario Virgen del Rocio
COMPLEJO HOSPITALARIO DE ESPECIALIDADES VIRGEN DE VALME	Eduardo Rios Herranz	CEI Sevilla Sur
HOSPITAL DEL MAR	Antonio Salar Silvestre	CEIC Parc de Salut Mar
HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA	Alejandro Martín García-Sancho	CEIC Área de Salud Salamanca
HOSPITAL UNIVERSITARIO DE BURGOS	Jorge Labrador Gómez	CEIC Área de Salud Burgos y Soria
HOSPITAL UNIVERSITARI I POLITÈCNIC LA FE	Josè Góme Códina	CEIC Hosp. Univ. la Fe

ANTONIO VELÁZQUEZ MARTÍNEZ COMO SECRETARIO/A DEL COMITÉ COORDINADOR DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE ANDALUCÍA

CERTIFICA

Que este Comité ha ponderado y evaluado en sesión celebrada el treinta de septiembre de dos mil catorce (Acta 08/14), y a propuesta del promotor GOTEL. Grupo Oncológico para el Tratamiento y Estudio de los Linfomas al Ensayo Clínico con código de protocolo del promotor R2-GDP-GOTEL y número de EudraCT 2014-001620-29 titulado:

Ensayo fase II para valorar la combinación de Lenalidomida con R-GDP (R2-GDP) en pacientes con linfoma difuso de células grandes B refractarios o en recaída (R/R LDCGB) no candidatos a quimioterapia a altas dosis y trasplante de células progenitoras hematopoyéticas

Protocolo Versión 1.1 de 08 de septiembre de 2014

HIPyCI GOTEL V1.1 de 08 de septiembre de 2014

Que a dicha sesión asistieron los siguientes integrantes del Comité:

- Sr. D. Demetrio Mariano Aguayo (Presidente. Medicina Interna, Hosp. Juan Ramón Jiménez. Huelva. HUELVA)
- Sr. D. Antonio Velázquez (Secretario. Med. Prev. y S.P. Consejería de I.S.yP.S. Sevilla. SEVILLA)
- Sr. D. Fernando Antúnez (Vicepresidente. Med. Prev. y S.P. Delegación Territorial de I.S.yP.S. Granada. GRANADA)
- Sra. D^a Macarena Anchóriz (Vocal. Pediatría. Hosp. Univ. Virgen del Rocio. Sevilla. SEVILLA)
- Sr. D. Jaime Torelló (Vocal. Farmacología Clínica. Hosp. Univ. Virgen del Rocio. Sevilla. SEVILLA)
- Sr. D. Enrique Raya (Vocal. Reumatología. Hosp. Univ. San Cecilio. Granada. GRANADA)
- Sra. D^a Isabel García (Vocal. Oncología Radioterápica. Hosp. Regional Univ. de Málaga. MALAGA)
- Sra. D^a Angela Ortega (Vocal. Enfermera, Complejo Hospitalario de Huelva)
- Sr. D. Pedro Sánchez (Vocal. Oncología Médica. Hospital de Jaén. JAEN)
- Sra. D^a Celia Castillo (Vocal. Lcda. en Derecho. Hosp. Torrecárdenas. Almería. ALMERIA)
- Sr. D. Daniel Palma (Vocal. Farmacéutico, Distrito Sanitario Sevilla)
- Sra. D^a María Victoria Casas (Vocal. Lcda. en Derecho. Consejería de I.S.y P.S. Sevilla. SEVILLA)
- Sra. D^a Matilde Vera (Vocal. Lcda. en Derecho. Servicio Andaluz de Salud. Sevilla.)
- Sr. D. Miguel Delgado (Vocal. Med. P.yS.P. Universidad de Jaén. JAEN)
- Sr. D. Miguel Angel Arrabal (Vocal. Urología, Hospital la Inmaculada de Huércal Overa)
- Sra. D^a Teresa Aldabó (Vocal. Medicina Intensiva, Hosp. Univ. Virgen del Rocio)
- Sr. D. Alberto Delgado (Vocal. Radiofarmacia. Hosp. Regional Univ. de Málaga. MALAGA)
- Sr. D. Jesús Gómez (Vocal. Medicina Interna. Hosp. Univ. de Valme. Sevilla. SEVILLA)



Código Seguro De Verificación:	H36S1YqxZJCg1hrUhbX5HA--	Fecha	16/10/2014		
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.				
Firmado Por	Antonio Velazquez Martinez				
Url De Verificación	https://ws059.juntadeandalucia.es/verifirma/code/H36S1YqxZJCg1hrUhbX5HA-	Página	2/3		

Anexo II. Consentimientos informados



Consentimiento informado por escrito

Título del Ensayo:

“Ensayo fase II para valorar la combinación de Lenalidomida con R-GDP (R2-GDP) en pacientes con linfoma difuso de células grandes B refractarios o en recaída (LDCGB R/R) no candidatos a quimioterapia a altas dosis y trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.”

Yo, _____ (nombre y apellidos)

He leído las hojas de información que se me han entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con _____ (investigador).

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Por tanto, presto libremente mi conformidad para:

- Participar en el estudio

- La disponibilidad de la información confidencial necesaria para el control y la garantía de calidad, por parte del personal asignado por el patrocinador, o el organismo elegido por el patrocinador, así como por las autoridades e instituciones competentes o, si fuera aplicable, por el Comité Ético.

- Archivar la información codificada y su transmisión fuera de la Comunidad Europea si fuera pertinente.

Fecha: ____/____/____

Firma del participante: _____

Fecha: ____/____/____

Firma del investigador: _____

Consentimiento informado oral ante testigos

Título del Ensayo:

“Ensayo fase II para valorar la combinación de Lenalidomida con R-GDP (R2-GDP) en pacientes con linfoma difuso de células grandes B refractarios o en recaída (LDCGB R/R) no candidatos a quimioterapia a altas dosis y trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.”

Yo, _____ (nombre y apellidos) declaro bajo mi responsabilidad que _____ (nombre del participante en el ensayo)

Ha recibido la hoja de información sobre el estudio.

Ha podido hacer preguntas sobre el estudio.

Ha recibido suficiente información sobre el estudio.

Ha sido informado por _____ (nombre investigador).

Comprende que su participación es voluntaria.

Comprende que puede retirarse del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que ello repercuta en sus cuidados médicos

Y ha expresado libremente su conformidad para participar en el estudio.

Fecha: ____/____/____

Firma del testigo: _____

Fecha: ____/____/____

Firma del investigador: _____

Consentimiento informado del Representante

Título del Ensayo:

“Ensayo fase II para valorar la combinación de Lenalidomida con R-GDP (R2-GDP) en pacientes con linfoma difuso de células grandes B refractarios o en recaída (LDCGB R/R) no candidatos a quimioterapia a altas dosis y trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.”

Yo, _____ (nombre y apellidos) en calidad
de _____ (relación con el participante)

de _____ (nombre del participante en el ensayo)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con _____ (nombre investigador).

Comprendo que la participación es voluntaria.

Comprendo que puede retirarse del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que ello repercuta en sus cuidados médicos

En mi presencia se ha dado a _____ (nombre del
participante) toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de
acuerdo en participar.

Y presto mi conformidad con que _____ (nombre
del participante) participe en este estudio.

Fecha: ___/___/___

Firma del representante: _____

Fecha: ___/___/___

Firma del investigador: _____

Consentimiento informado en caso de Embarazo

Título del Ensayo:

“Ensayo fase II para valorar la combinación de Lenalidomida con R-GDP (R2-GDP) en pacientes con linfoma difuso de células grandes B refractarios o en recaída (LDCGB R/R) no candidatos a quimioterapia a altas dosis y trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.”

_____ (nombre y apellidos de la madre) y

_____ (nombre y apellidos del padre)

Hemos leído las hojas de información que se nos han entregado.

Hemos podido hacer preguntas sobre el estudio.

Hemos recibido suficiente información sobre los riesgos del embarazo en el estudio.

Hemos hablado con _____ (nombre investigador).

Comprendemos que la cesión de nuestros datos sobre el embarazo y datos posteriores al nacimiento del bebé es voluntaria, sin que por ello se altere la relación con nuestro médico ni se produzca perjuicio alguno en el tratamiento.

Por tanto, prestamos libremente nuestra conformidad para:

- La disponibilidad de la información confidencial necesaria para el control y la garantía de calidad, por parte del personal asignado por el patrocinador, o el organismo elegido por el patrocinador, así como por las Autoridades e Instituciones competentes o, si fuera aplicable, por el Comité Ético.
- Archivar la información codificada y su transmisión fuera de la Comunidad Europea si fuera pertinente.

Fecha: ____/____/____

Firma de la madre: _____

Fecha: ____/____/____

Firma del padre: _____

Fecha: ____/____/____

Firma del investigador: _____

Notas

Notas

Notas

Notas

Notas

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR E INMUNOLOGÍA

GOTEL

Grupo Oncológico para el
Tratamiento y Estudio de los Tumores

HUM

Hospital Universitario
Virgen Macarena

