



## CIENCIAS BIOMÉDICAS

Artículo original de investigación

# Marcadores de inmunosenescencia e inflamación en pacientes con cáncer de pulmón tratados con quimioterapia, Biomodulina T y CIMAvax-EGF

Danay Saavedra Hernández <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6614-3819>

Ana Laura Añé Kourí <sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0003-1426-3162>

Gisela María Suárez Formigo <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8883-4197>

Karla Pereira Yañez <sup>1</sup> <https://orcid.org/0009-0001-2348-0508>

Mauricio Catalá Ferrer <sup>2</sup> <https://orcid.org/0009-0003-9197-132X>

Yadira Elvira Pea Guerra <sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-0006-7366>

Susana Portela Collazo <sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8888-639X>

Nuris Ledón Naranjo <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3284-0541>

Alexa Silva Sosa <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-2221-984X>

Agustín Lage Dávila <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9472-9158>

<sup>1</sup> Centro de Inmunología Molecular. La Habana, Cuba

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas. La Habana, Cuba

\* Autor para la correspondencia: [analaura@cim.sld.cu](mailto:analaura@cim.sld.cu)

### Editor

Lisset González Navarro  
Academia de Ciencias de Cuba.  
La Habana, Cuba

### Traductor

Darwin A. Arduengo García  
Academia de Ciencias de Cuba.  
La Habana, Cuba

### RESUMEN

**Introducción:** El cáncer de pulmón es una de las enfermedades oncológicas con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial. **Objetivo:** Determinar la relación entre los marcadores de inmunosenescencia y de inflamación sistémica, así como evaluar el impacto de la terapia secuencial con Biomodulina T y la vacuna terapéutica CIMAvax-EGF. **Métodos:** Se estudiaron pacientes con cáncer de pulmón avanzado a los que se determinaron las subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo, las citocinas proinflamatorias IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , así como la concentración de EGF en suero y los títulos de anticuerpos específicos contra el EGF (anti-EGF). **Resultados:** En los pacientes tratados con quimioterapia se observó una menor frecuencia de linfocitos vírgenes y de memoria central y una mayor frecuencia de aquellos con mayor grado de diferenciación. Se demostró la correlación positiva entre IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , así como de éstas con varias subpoblaciones de células T terminalmente diferenciadas. El uso de Biomodulina T después de la quimioterapia disminuyó las células T CD4+ y CD8+ terminalmente diferenciadas y que expresan PD1, e indujo la expansión de linfocitos T CD4+ vírgenes. En pacientes que recibieron Biomodulina T, se observó una buena respuesta de anticuerpos anti-EGF en más del 84 % de los casos tras la fase de inducción con CIMAvax-EGF. Estos pacientes alcanzaron una mediana de supervivencia global superior a los 16 meses. **Conclusiones:** Se evidenció la asociación entre células T terminalmente diferenciadas con citocinas proinflamatorias en el escenario del cáncer de pulmón y el tratamiento citotóxico. La inmunorestauración generada por la administración de Biomodulina T potenció la respuesta de anticuerpos anti-EGF e indujo un beneficio en la supervivencia de los pacientes

que recibieron tratamiento con la vacuna CIMAvax-EGF, lo que sugiere el efecto positivo de la combinación secuencial de ambos productos.

**Palabras clave:** cáncer de pulmón; inmunosenescencia; inflamación crónica; inmunoterapia

## Immunosenescence and inflammation markers in lung cancer patients treated with chemotherapy, Biomodulina T and CIMAvax-EGF

### ABSTRACT

**Introduction:** Lung cancer is one of the oncological diseases with the highest incidence and mortality worldwide. **Objective:** To determine the relationship between immunosenescence and systemic inflammation markers, as well as to evaluate the impact of sequential therapy with Biomodulina T and the CIMAvax-EGF therapeutic vaccine. **Methods:** Patients with advanced lung cancer were studied to determine lymphocyte subpopulations, the proinflammatory cytokines IL-6, IL-1 $\beta$ , and TNF $\alpha$ , as well as the serum EGF concentrations and titers of specific antibodies to EGF (anti-EGF). **Results:** In patients treated with chemotherapy, a lower frequency of naive and central memory lymphocytes and a higher frequency of those with a higher degree of differentiation were observed. It was demonstrated positive correlation between IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ , and between these, with subpopulations of terminally differentiated T cells. The use of Biomodulina T after chemotherapy decreased terminally differentiated CD4+ and CD8+ T cells expressing PD1, and induced the expansion of naive CD4+ T cells. In patients who received Biomodulina T, a good anti-EGF antibody response was observed in more than 84% of cases after the induction phase with CIMAvax-EGF. These patients achieved a median overall survival of over 16 months. **Conclusions:** The association between terminally differentiated T cells with proinflammatory cytokines was evidenced in the setting of lung cancer. The immunorestitution generated by the administration of Biomodulina T potentiated the anti-EGF antibody response and induced a benefit in the survival of patients who received treatment with the CIMAvax-EGF vaccine, suggesting the positive effect of the sequential combination of both products.

**Keywords:** lung cancer; immunosenescence; chronic inflammation; immunotherapy

## INTRODUCCIÓN

El cáncer representa un problema de salud de creciente importancia en el mundo. En 2020 la localización tumoral con mayor número de incidencia y mortalidad, con un estimado de 2,2 millones de casos nuevos y 1,8 millones de muertes fue el cáncer de pulmón. <sup>(1,2)</sup> En Cuba el cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en ambos sexos, responsable de alrededor 5000 defunciones anuales. <sup>(3)</sup> Se considera el envejecimiento el factor de riesgo más importante para la mayoría de las neoplasias malignas comunes. Cuba tiene una de las poblaciones más envejecidas de América Latina, con un 20,1 % de individuos por encima de 60 años y una expectativa de vida de 78,45 años. <sup>(4,5)</sup>

El envejecimiento se caracteriza por una remodelación inmune gradual con disminución del compartimento de cé-

lulas T vírgenes, acumulación de células T de memoria y expresión reducida de moléculas coestimuladoras inmunes, proceso comúnmente llamado inmunosenescencia. Está asociado con una inflamación crónica, estéril y de bajo grado denominada en inglés como *inflammaging*. <sup>(6,7)</sup> Recientemente se ha postulado que ambos son estados mutuamente mantenidos, donde la inmunosenescencia es inducida por el *inflammaging* y viceversa. <sup>(7)</sup> Sin embargo, la evidencia de las asociaciones entre linfocitos terminalmente diferenciados y las citocinas proinflamatorias en los pacientes con cáncer y su relación con los tratamientos citotóxicos está poco documentada. <sup>(8)</sup>

La quimioterapia de primera línea, basada en platinos, induce expansión de poblaciones de linfocitos T terminalmente diferenciados. <sup>(9)</sup> En este contexto la administración de Bio-

modulina T (BT), una fracción polipeptídica obtenida en Cuba del timo bovino, registrada en 1994 para el tratamiento de infecciones recurrentes en ancianos, pudiera constituir una estrategia de inmunorestauración y potenciar la respuesta a las inmunoterapias contra tumores malignos, ya que ha demostrado capacidad para expandir linfocitos T CD4+ vírgenes y disminuir células T CD4+ y CD8+ que expresan la proteína de muerte celular programada 1 (PD1), sin expandir linfocitos T reguladores en adultos mayores. <sup>(10,11)</sup>

La vacuna terapéutica CIMAvax-EGF, diseñada y producida en el Centro de Inmunología Molecular (CIM), se emplea en pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), al concluir el tratamiento de quimioterapia de primera línea. Su amplia utilización en el escenario clínico ha demostrado que es segura e inmunogénica, pues induce anticuerpos que neutralizan el factor de crecimiento epidérmico circulante (EGF por sus siglas en inglés epidermal growth factor) y de este modo evitan su unión al receptor de EGF e inhiben la proliferación de las células tumorales. <sup>(12)</sup>

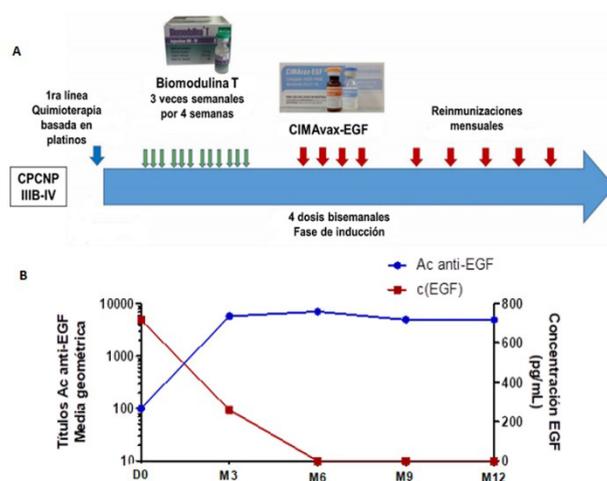
Con estos antecedentes la presente investigación se propuso como objetivos determinar la relación entre los marcadores de inmunosenescencia, de inflamación sistémica y el factor de crecimiento epidérmico, en pacientes con cáncer de pulmón avanzado; así como evaluar el impacto de la terapia secuencial con Biomodulina T y la vacuna terapéutica CIMAvax-EGF, en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas.

## MÉTODOS

### Selección y tratamiento de los pacientes

Para la realización de este trabajo se estudiaron 64 pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón avanzado en estadio IIIB o IV, en 2 bloques experimentales. Para el primer bloque de estudio se incluyeron 46 pacientes con CPCNP avanzado, incluidos en 2 ensayos clínicos diseñados y conducidos por el CIM (EC151 y EC157). Los pacientes se subdividieron teniendo en cuenta el tratamiento recibido hasta el momento de la evaluación: 16 pacientes de nuevo diagnóstico, vírgenes de tratamiento y 30 tratados con quimioterapia de primera línea, basada en platinos. Se evaluaron marcadores de inmunosenescencia, de inflamación y EGF en la sangre periférica de todos los pacientes.

En el segundo bloque experimental se incluyeron 18 pacientes con diagnóstico de CPCNP avanzado. Los pacientes incluidos en esta etapa del estudio recibieron 4-6 ciclos de quimioterapia a base de platinos y 1 semana después de concluido se le administró BT, 1 bulbo 3 veces por semana durante 4 semanas. Las evaluaciones clínicas e inmunológicas se realizaron entre (5-7) d después de concluir la quimioterapia, entre (5-7) d después de finalizar la administración de Biomodulina, momento en el cual se inició el tratamiento con CIMAvax-EGF (figura 1A) y pasados (3, 6 y 12) meses de iniciar la inmunización con CIMAvax-EGF. Los pacientes fueron atendidos en la unidad de oncología del Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas (CIMEQ) de La Habana.



**Fig. 1.** A) Esquema de la combinación secuencial de Biomodulina T y CIMAvax-EGF en pacientes con CPCNP en estadios avanzados; B) Cinética de los títulos de anticuerpos anti-EGF y la concentración de EGF en pacientes con CPCNP avanzado, vacunados con CIMAvax-EGF. Leyenda: CPCNP, Cáncer de pulmón de células no pequeñas; M, mes; Ac, anticuerpo; c, concentración

## Determinación de subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo

Las muestras de sangre total recibidas en tubos con anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) fueron procesadas y se procedió a la lisis de los hematíes. Se marcaron las células con los anticuerpos seleccionados previa titulación.

Las células mononucleares de sangre periférica se marcaron con los AcMs siguientes: anti-CD3 (RPE-Cy5, UCHT1, Bio-Rad y PE-Cy7, CiCHT1, eBioscience), anti-CD4 (PE, RPA-T4, BD Pharmingen; FITC, RPA-T4, BD Pharmingen y Alexa Fluor 700, RPA-T4, Biolegend), anti-CD8 (PE, clon RPA-T8, BD Pharmingen, PE-Cy™7, clon RPA-T8, BD Pharmingen y APC, clon B4918, Beckman Coulter), anti-CCR7 (AF, Alexa fluor 647, clon 150503, BD Pharmingen y APC Cy7, clon 2043177, Biolegend), anti-CD45RA (PE- CF594, clon H100, BD Horizon), anti-CD28 (APC-H7, clon CD28.2, BD Pharmingen, PE, clon CD28.2, BD Pharmingen y PE, clon CD28.2, BD Pharmingen), CD19 (PerCP-Cy5.5, clon HIB19, BD Pharmingen y PE-Cy7, clon HIB19, Biolegend) y anti-IgD (FITC, clon IA6- 2, BD Pharmingen), anti-CD27 (PE-Cy7, clon O323, eBioscience y PE, clon, M-T271, BD Pharmingen) y anti-CD57 (FITC, clon TB01, Bio-Rad), anti-PD1 (PE Cy7, clon J105), anti-CD56 (PE clon BG1398 AA, Beckman Coulter), anti-CD16 (PerCP-5.5, B61376AA, Beckman Coulter).

La lectura, fue realizada en un citómetro de flujo Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter, EE. UU.) usando el programa de adquisición Beckman Coulter 2.1 (Beckman Coulter, EE. UU.). Todos los datos obtenidos se procesaron en el programa FlowJo vX0.7 (Tree Star Inc., EE. UU.).

## Determinación de citocinas proinflamatorias IL-6, IL-1 $\beta$ y TNF $\alpha$

Las concentraciones de IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  se determinaron por un ensayo inmunoenzimático (ELISA) cuantitativo tipo *sándwich* (Human IL-6 Quantikine ELISA, R&D, Canadá, Human IL-1 $\beta$  Quantikine ELISA, R&D, Canadá, Human TNF $\alpha$  Quantikine ELISA, R&D, Canadá), según especificaciones del fabricante.

## Determinación de la concentración de EGF en suero y de los títulos de anticuerpos específicos contra el EGF (anti-EGF)

Las concentraciones de EGF en suero se determinaron por un ensayo cuantitativo inmunoenzimático ultramicroanalítico de tipo *sándwich* (UMELISA EGF humano, código UM 2040, Tecnosuma, Cuba), según especificaciones del fabricante.

El título de anticuerpos (Acs) anti-EGF fue determinado por un ensayo semicuantitativo inmunoenzimático, desarrollado y validado en el CIM. Para evaluar la inmunogenicidad

del preparado vacunal se establecieron diferentes criterios de respuesta, de acuerdo a los títulos de Acs anti-EGF. Se consideraron respondedores (seroconversión) aquellos pacientes que, producto de la vacunación, al menos duplicaron sus niveles originales de títulos de Acs anti-EGF. Adicionalmente los pacientes se clasificaron como buenos respondedores (BR), si alcanzaron títulos de Acs anti-EGF mayores o iguales que 1:4000 (dilución del suero) y malos respondedores, si no cumplieron la condición anterior. <sup>(13)</sup>

## Análisis estadístico

Se calcularon los estadígrafos descriptivos de las variables inmunológicas y se realizaron gráficos de datos agrupados. Se utilizaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para determinar ajuste a distribución normal de las variables. Se compararon las variables cuantitativas entre los 2 grupos de estudio (pacientes vírgenes de tratamiento y tratados con quimioterapia) utilizando la prueba t para muestras independientes o la prueba de Mann-Whitney, cuando los datos pasaron o no la prueba de normalidad respectivamente. Para la comparación de las variables inmunológicas antes y después del tratamiento con Biomodulina T se utilizó la prueba t pareada y la prueba de Wilcoxon, cuando los datos pasaron o no la prueba de normalidad, respectivamente.

Para evaluar la asociación entre las citocinas y las subpoblaciones celulares se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson o Spearman, cuando los datos pasaron o no la prueba de normalidad respectivamente y las pruebas de hipótesis para conocer su significación. La supervivencia global (desde la fecha de la primera vacunación hasta la fecha de la muerte o fecha de última noticia) se estimó mediante el método de Kaplan-Meier.

Se utilizó la regresión de Cox para el análisis de supervivencia en relación con la diferencia entre las frecuencias de linfocitos T CD4+PD1+ y T CD8+PD1+ luego de la quimioterapia y al terminar la administración de biomodulina T. Los grupos de pacientes con una diferencia alta y baja de linfocitos T CD4+PD1+ se determinaron a partir del punto de corte previamente calculado por prueba estadística de rango logarítmico seleccionada al máximo. La comparación de supervivencia entre los grupos se realizó con una prueba estándar de rango logarítmico. De acuerdo con la metodología propuesta por Lambert PC y colaboradores. <sup>(14)</sup> Todos los análisis se realizaron empleando los programas estadísticos GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., EE. UU.), SPSS (versión 21) y R versión 3.5 (R Core Team, EE. UU.).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Marcadores de inmunosenescencia e inflamación en pacientes con cáncer de pulmón avanzado vírgenes de tratamiento y tratados con quimioterapia basada en platinos

De los 46 pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón en estadios IIIB y IV incluidos en el primer bloque de estudio, 30 recibieron quimioterapia y el resto ( $n = 16$ ) fueron pacientes de nuevo diagnóstico vírgenes de tratamiento. Ambos grupos fueron similares en su distribución por edades (media: 66,46 y 62,25 respectivamente) y predominó el sexo masculino (71,74 %).

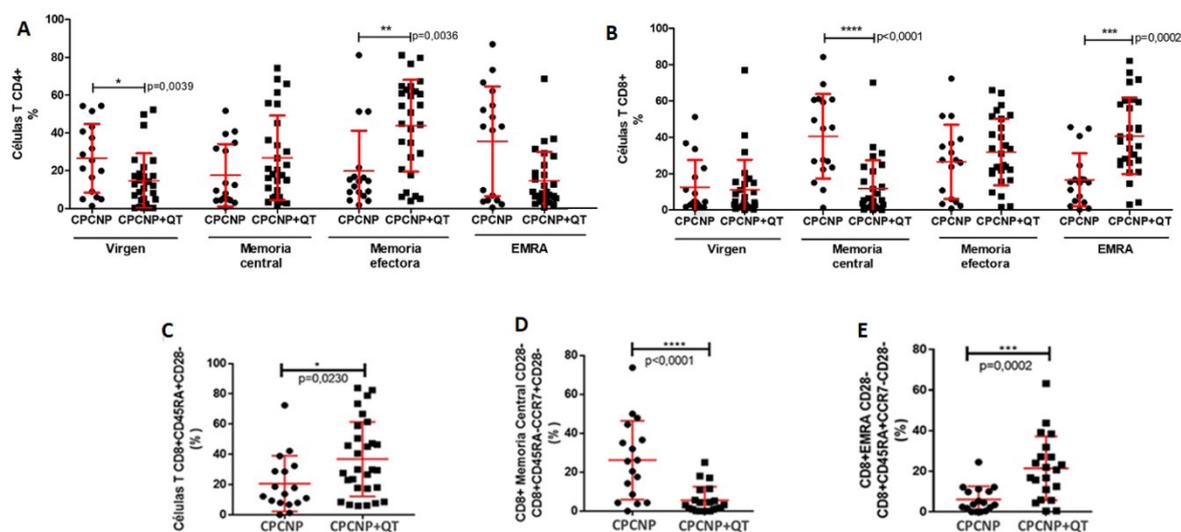
Al evaluar el estadio de diferenciación de las subpoblaciones linfocitarias T CD4+ y T CD8+ a partir de la expresión de las moléculas CD45RA y CCR7, se observó que las frecuencias de linfocitos T CD4+ vírgenes (CD45RA+CCR7+) y CD8+ de memoria central (CD45RA-CCR7+), fueron significativamente menores en aquellos que recibieron quimioterapia basada en platinos con respecto a los pacientes vírgenes de tratamiento ( $p = 0,0039$ ;  $p < 0,0001$ ) respectivamente, prueba de Mann Whitney (figura 2A y B). Por el contrario, las frecuencias de linfocitos T CD4+ de memoria efectora (CD45RA-CCR7-) y T CD8+ de memoria terminalmente diferenciadas que reex-

presan CD45RA (CD45RA+CCR7-) fueron significativamente mayores en aquellos pacientes tratados con quimioterapia respecto a los pacientes de nuevo diagnóstico ( $p = 0,0036$ ;  $p = 0,0002$ , respectivamente; prueba de Mann Whitney; figura 1A, B). En el caso del compartimento de células B, se observó una menor frecuencia de linfocitos B vírgenes (CD19+CD27-IgD +;  $p = ,0243$ ; prueba de Mann Whitney) en los pacientes tratados con quimioterapia (datos no mostrados).

Al evaluar los niveles séricos de citocinas proinflamatorias IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en pacientes con CPCNP, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de estudio (datos no mostrados). Por su parte, las concentraciones séricas de EGF resultaron significativamente mayores en pacientes que no habían recibido tratamiento con quimioterapia ( $p = 0,0272$ ; prueba de Mann-Whitney; datos no mostrados).

### Asociación entre EGF, marcadores de inmunosenescencia y de inflamación sistémica en pacientes con cáncer de pulmón avanzado

La asociación entre mediadores solubles de inflamación EGF y subpoblaciones de linfocitos fue explorada en pacientes de CPCNP vírgenes de tratamiento y tratados con quimio-



**Fig. 2.** Subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes con CPCNP, vírgenes de tratamiento y tratados con quimioterapia; A) Estadios de diferenciación de linfocitos T CD4+; B) Estadios de diferenciación de linfocitos T CD8+; C) Estadios de diferenciación de linfocitos T CD4+; D) Estadios de diferenciación de linfocitos B CD19+. En los gráficos se representa la media y desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos: (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ ; prueba de Mann-Whitney. Virgen (CD45RA+CCR7+); memoria central (CD45RA-CCR7+); memoria efectora (CD45RA-CCR7-) y linfocito T de memoria efectora que reexpresa CD45RA (EMRA, CD45RA+CCR7-). Leyenda: CPCNP, Cáncer de pulmón de células no pequeñas; CPCNP, pacientes vírgenes de tratamiento; CPCNP+QT, pacientes que recibieron quimioterapia

terapia de primera línea. Al analizar la relación entre los niveles séricos de citocinas proinflamatorias se encontró una correlación directa significativa entre las concentraciones séricas de IL-1β y TNFα (r = 0,97; p < 0,0001, prueba de Pearson) en pacientes con CPCNP vírgenes de tratamiento y en pacientes tratados con quimioterapia basada en platinos (r = 0,89; p < 0,0001, prueba de Pearson). Sin embargo, no se identificó relación entre estas y la IL-6, ni entre los mediadores proinflamatorios (IL-1β, IL-6, TNFα) y el EGF en ninguno de los momentos estudiados (datos no mostrados).

Al estudiar la relación entre los niveles séricos de las citocinas y las células T terminalmente diferenciadas, se observó

una correlación significativa (r = 0,5835; p < 0,0224, prueba de Pearson) entre TNFα y células T CD8+EMRA (CD45RA+CCR7-) en pacientes sin tratamiento previo. Por su parte, en aquellos que recibieron quimioterapia basada en platinos se observó que las concentraciones séricas de TNFα tuvieron una correlación directa significativa con linfocitos T terminalmente diferenciados, principalmente CD28 negativos y CD27 negativos que expresaban CD57. De manera similar la IL-1β tuvo una correlación positiva con células T de diferenciación terminal. Por el contrario, IL-6 solo correlacionó con linfocitos T CD4+CD45RA+CCR7-CD28- (r = 0,4954; p = 0,0224, prueba de Pearson) (tabla 1).

**Tabla 1.** Asociaciones entre factor de crecimiento epidérmico, citocinas proinflamatorias y subpoblaciones linfocitarias en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas

Citocinas	Subpoblaciones celulares	TNFα	IL-1β	IL-1β	IL-6	EGF
Pacientes sin tratamiento previo	Células T CD8+	CD45RA+CCR7-	r = 0,5835; p = 0,0224	r = 0,4961; p = 0,06	r = 0,0857; p = 0,7523	r = 0,0522; p = 0,8477
	Células B CD19+	IgD-CD27+	r = -0,084; p = 0,7005	r = -0,2894; p = 0,356	r = 0,067; p = -0,826	r = 0,58; p = 0,0224
Pacientes tratados con quimioterapia	Células T CD4+	CD45RA+CD28-	r = 0,6512; p = 0,0034	r = 0,0986; p = 0,6317	r = -0,0997; p = 0,6315	r = -0,2188; p = 0,2633
		CD45RA+CD57+	r = 0,7977; p = 0,01	r = 0,6365; p = 0,0352	r = -0,0679; p = 0,834	r = 0,105; p = 0,7454
		CD45RA+CD27- CD57+	r = 0,8024; p = 0,0052	r = 0,699; p = 0,0114	r = -0,028; p = 0,9277	r = 0,1339; p = 0,6628
		CD45RA+CD28- CD57+	r = 0,7378; p = 0,0101	r = 0,7074; p = 0,0101	r = -0,0443; p = 0,8858	r = 0,2043; p = 0,5032
		CD45RA+CD27- CD28- CD57+	r = 0,9102; p = 0,0003	r = 0,7513; p = 0,0048	r = 0,0705; p = 0,8189	r = 0,0519; p = 0,8663
		CD45RA+CCR7- CD28-	r = 0,4125; p = 0,0889	r = 0,0513; p = 0,8337	r = 0,4954; p = 0,0224	r = -0,3505; p = 0,1192
		CD45RA-CCR7- CD57+	r = -0,2834; p = 0,4276	r = -0,0782; p = 0,8091	r = -0,0711; p = 0,8179	r = 0,6154; p = 0,0252
	CD28-CD57+	r = -0,1572; p = 0,6645	r = -0,04; p = 0,9017	r = 0,0795; p = 0,7963	r = 0,5571; p = 0,048	
Células T CD8+	Células T CD8+	CD45RA+CD28-	r = 0,5695; p = 0,0136	r = 0,5258; p = 0,0972	r = 0,0477; p = 0,8057	r = -0,1258; p = 0,5156
		CD45RA+CD57+	r = 0,6891; p = 0,0275	r = 0,5653; p = 0,0554	r = -0,1474; p = 0,6309	r = -0,179; p = 0,5585
		CD45RA+CD28- CD57+	r = 0,7242; p = 0,0179	r = 0,5573; p = 0,0598	r = -0,1153; p = 0,7017	r = -0,0364; p = 0,906
		CD45RA+CD27- CD28- CD57+	r = 0,7381; p = 0,0179	r = 0,5796; p = 0,0482	r = -0,0901; p = 0,7698	r = 0,0147; p = 0,962
		CD28-CD57+	r = 0,7381; p = 0,0179	r = 0,5796; p = 0,0482	r = -0,0901; p = 0,7698	r = 0,0147; p = 0,962

Coefficiente de correlación y asociaciones estadísticas significativas están marcadas en negrita. r: Coeficiente de correlación de Pearson. CPCNP: Cáncer de pulmón de células no pequeñas.

La concentración de EGF circulante tuvo una correlación directa positiva con las células B de memoria con cambio de clase (CD19+IgD-CD27+) ( $r = 0,558$ ;  $p = 0,0224$ , prueba de Pearson) en pacientes sin tratamiento previo y con las células T terminalmente diferenciadas CD4+CD28-CD57+ ( $r = 0,5571$ ;  $p = 0,048$ ; prueba de Pearson) y células T CD4+ de memoria efectora CD57+ (CD4+CD45RA-CCR7-CD57+;  $r = 0,6154$ ;  $p = 0,0252$ , prueba de Pearson) en pacientes tratados con quimioterapia de primera línea (ver tabla 1).

### Efecto de la Biomodulina T sobre subpoblaciones linfocitarias en pacientes con cáncer de pulmón avanzado después de la quimioterapia

Se evaluó el efecto de la Biomodulina T sobre subpoblaciones linfocitarias en 18 pacientes con cáncer de pulmón avanzado al culminar el tratamiento con quimioterapia de primera línea, basada en platinos.

Al terminar el tratamiento con el factor tímico se observó una disminución significativa en los porcentajes de linfocitos CD4 ( $p = 0,0031$ ; prueba de Wilcoxon) (figura 3A) y CD8+ ( $p = 0,0372$ ; prueba t pareada) (figura 3B) de diferenciación terminal (CD45RA+CCR7-). Para este mismo momento se demostró la disminución significativa en los porcentajes de linfocitos T CD4+PD1+ y T CD8+PD1+ ( $p = 0,0005$ ;  $p < 0,0001$ ; prueba de Wilcoxon) (figura 3C), así como de las células T CD8+CD28- PD1+ ( $p = 0,0479$ ; prueba de Wilcoxon) (ver figura 3D) y CD8+CD45RA+CD28-PD1+ (relacionadas con el fenómeno de agotamiento de la res-

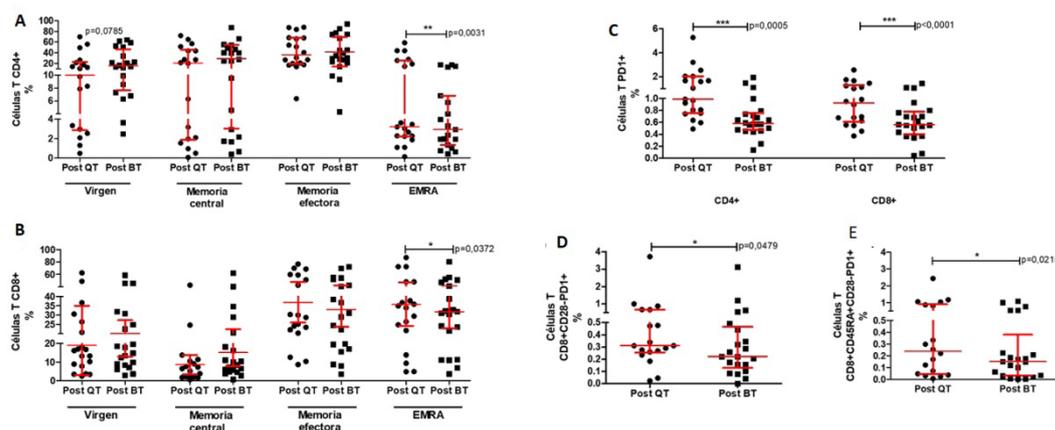
( $p = 0,015$ ; prueba de Wilcoxon) (figura 3E). Adicionalmente, al finalizar el tratamiento con BT la frecuencia de linfocitos T CD4+ vírgenes se incrementó significativamente en el 70 % de los pacientes (datos no mostrados).

### Títulos de anticuerpos anti-EGF y supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón avanzado tratados con Biomodulina T y CIMAvax-EGF

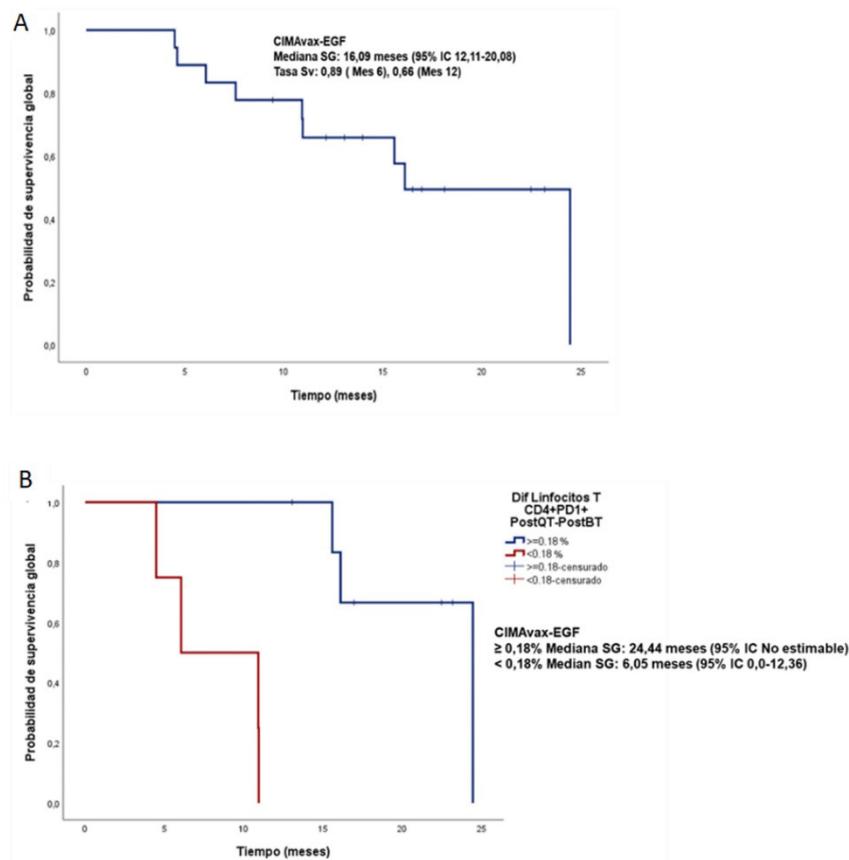
Entre (5-7) d posteriores al final de la administración de BT se inició el tratamiento con CIMAvax-EGF. Los títulos de anticuerpos anti-EGF aumentaron durante la fase de inducción (primeras 4 dosis, cada 14 d), hasta alcanzar una meseta durante la fase de mantenimiento (reinmunización mensual) (ver figura 1B), como se ha descrito previamente en el tratamiento con CIMAvax-EGF. (15) Para este momento el porcentaje de pacientes que alcanzó la condición de buenos respondedores fue de 84,2 % y al sexto mes de vacunación esta proporción se elevó al 93,3 %.

Al realizar el análisis de supervivencia de los pacientes tratados con la administración secuencial de BT y CIMAvax-EGF, la mediana del tiempo de supervivencia (MST) fue de 16,09 meses (95 % IC 12,11-20,08 meses) (figura 4A). La tasa de supervivencia global (SG) a los (6 y 12) meses fue del 89 % y 66 %, respectivamente.

Para evaluar la relevancia clínica de la contracción de las poblaciones de linfocitos T CD4+ y T CD8+ que expresaban PD1 (relacionadas con el fenómeno de agotamiento de la res-



**Fig. 3.** Subpoblaciones de células T CD4+ y CD8+ después de la quimioterapia de primera línea basada en platinos y al final de la administración de Biomodulina T en pacientes diagnosticados con CPCNP; A) Estadios de diferenciación de linfocitos T CD4+; B) Estadios de diferenciación de linfocitos T CD8+; C) Células T CD4+PD1+ y células T CD8+PD1+; D) Células T CD8+CD28-PD1+; E) Células T CD8+CD45RA+CD28-PD1+. Se representa la media y desviación estándar (A y B) y mediana con el rango intercuartil (C, D y E). Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos: (\*) ( $p < 0,05$ ); (\*\*) ( $p < 0,01$ ); usando la prueba de Wilcoxon y la prueba t pareada. Leyenda: linfocito T, Virgen (CD45RA+CCR7+), memoria central (CD45RA-CCR7+), memoria efectora (CD45RA-CCR7-) y linfocito T de memoria efectora que reexpresa CD45RA (EMRA, CD45RA+CCR7-). Post-QT, después de la quimioterapia; post-BT, Al final de la administración de biomodulina T; CPCNP, Cáncer de pulmón de células no pequeñas



**Fig. 4.** Análisis de supervivencia en pacientes diagnosticados con CPCNP, tratados con Biomodulina T y la vacuna CIMAvax-EGF después de quimioterapia basada en platinos. A) Curva de supervivencia global; B) Curva de supervivencia global para los pacientes estratificados de acuerdo con la diferencia en el porcentaje de linfocitos T CD4+PD1+ después de la quimioterapia basada en platinos y al final de la administración de Biomodulina T. Leyenda: SG, supervivencia global; Sv, supervivencia; IC, intervalo de confianza; SLP, supervivencia libre de progresión; dif, diferencia; Post-QT, después de la quimioterapia; Post-BT, al final de la administración de biomodulina T; CPCNP, cáncer de pulmón de células no pequeñas.

puesta inmune) después del tratamiento con BT, se asociaron la supervivencia de los pacientes y la diferencia de las células T CD4+PD1+ y T CD8+PD1+ antes y después de la administración de BT. Se demostró una asociación inversa significativa entre la diferencia de los linfocitos T CD4+PD1+ y la supervivencia global ( $p = 0,046$ ; regresión de Cox), es decir, a medida que la diferencia aumentaba, el riesgo de morir disminuía. Para seleccionar los pacientes con mayor beneficio de entre todos los tratados con CIMAvax-EGF, el punto de corte correspondió con 0,18 % de diferencia. Los pacientes con una diferencia mayor de 0,18 %, alcanzaron una mediana de supervivencia de 24,44 meses (95 % IC no estimable); mientras que aquellos con una diferencia menor de 0,18 % alcanzaron una mediana de supervivencia de 6,05 meses (95 % IC 0,0-12,36 meses). En contraste, no se encontró asociación entre los linfocitos T CD8+PD1+ y la supervivencia global de los pacientes ( $p = 0,203$ ; regresión de Cox; datos no mostrados).

La interpretación de la inmunosenescencia y la inflamación como estados mutuamente mantenidos y que a su vez estos contribuyen al desarrollo y mantenimiento del cáncer se ha discutido profundamente en la literatura.<sup>(7)</sup> Sin embargo, la evidencia de la relación entre la inmunosenescencia y la inflamación, en el contexto del tumor y los tratamientos oncológicos ha sido escasamente reportada.

En este estudio se describe la asociación entre marcadores de inmunosenescencia e inflamación y cómo los cambios que ocurren en el compartimento linfocitario de pacientes con cáncer de pulmón después de la quimioterapia basada en platinos, pueden ser modificados con la administración de BT y así contribuir al beneficio de la respuesta inmune específica y la supervivencia de pacientes con CPCNP avanzado que reciben tratamiento con la vacuna terapéutica cubana CIMAvax-EGF.

En pacientes con CPCNP el tratamiento con quimioterapia basada en platinos redujo de manera significativa las fre-

cuencias de linfocitos de menor diferenciación e incrementó las poblaciones celulares inmunes de mayor diferenciación. La evidencia de que la quimioterapia puede inducir la diferenciación y el desarrollo de células de memoria efectoras tumor específicas, como los linfocitos T CD4+ de memoria efectora, ha sido previamente descrito. <sup>(16)</sup>

Este trabajo explora igualmente las relaciones entre las células terminalmente diferenciadas y las citocinas proinflamatorias. Curiosamente, subpoblaciones de linfocitos T con pérdida de la expresión de CD27, CD28 y positivos para CD57, correlacionaron significativamente con la concentración sérica de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , lo cual apoya la teoría de que los linfocitos terminalmente diferenciados son fuente de citocinas proinflamatorias y presentan un fenotipo secretor asociado a la senescencia que contribuye al microambiente infamatorio. <sup>(17)</sup> Un hallazgo de esta investigación corresponde a la correlación directa entre los niveles séricos de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , antes y después de la quimioterapia. El hecho de que esta correlación se observó antes del tratamiento y se conserva después, indica que la inflamación sistémica es inducida tanto por el microambiente tumoral como a consecuencia de la terapia citotóxica.

Adicionalmente, se encontró una correlación positiva entre los niveles séricos de EGF y las células B de memoria con cambio de clase. Esta relación supone una interesante reflexión. Por un lado, se ha reportado un beneficio en la supervivencia en los pacientes con CPCNP con altas concentraciones de EGF, tratados con CIMAvax-EGF. <sup>(15)</sup> Por otro lado, las células B de memoria permanecen por décadas y en los momentos de reactivación, generan una acelerada y robusta respuesta de anticuerpos. <sup>(18)</sup> Teniendo en cuenta ambas evidencias se interpreta muy conveniente que los pacientes con cáncer de pulmón y altas concentraciones de EGF sean capaces a su vez de generar una robusta respuesta de anticuerpos y en especial de anticuerpos anti-EGF, si reciben tratamiento con CIMAvax-EGF, para de este modo controlar la enfermedad tumoral y reforzar la idea de la importancia de la castración inmune del EGF.

En el presente estudio los cambios inducidos por la quimioterapia en los marcadores de inmunosenescencia se modificaron mediante la administración de Biomodulina T. El tratamiento con BT redujo de manera significativa la frecuencia de las poblaciones de células T de mayor diferenciación en pacientes con cáncer de pulmón avanzado. Adicionalmente, se demostró la capacidad de la BT para reducir significativamente las células T CD4+ y CD8+ que expresan PD1. Estos hallazgos están en línea con un estudio previo realizado por nuestro grupo en ancianos con historia de infecciones respiratorias recurrentes y no otra enfermedad crónica, en los que el tratamiento con BT redujo las células T CD4+PD1+ y

CD8+PD1+. Por lo que, estos resultados resaltan el valor antiagotamiento de la respuesta inmune de la Biomodulina T. <sup>(11)</sup>

El hecho de superar el agotamiento inmunológico es un objetivo importante para mejorar las respuestas a las terapias contra el cáncer. Los inhibidores de PD1 y PDL1 han demostrado que la inmunoterapia impide la progresión tumoral y aumenta significativamente la supervivencia en pacientes con cáncer avanzado, incluido el CPCNP, <sup>(19,20)</sup> lo que refleja la importancia de la molécula PD1 en la carcinogénesis y la reversibilidad de su expresión en linfocitos T agotados. <sup>(17,21-23)</sup> Los autores hipotetizamos que la reducción de células T PD1+ pudiera contribuir a un mayor beneficio en la supervivencia de los pacientes que padecen de una enfermedad oncológica. En consonancia, este trabajo reporta que los pacientes con una mayor disminución de linfocitos T CD4+PD1+ al final de la administración de BT, alcanzaron una mayor supervivencia al recibir tratamiento con CIMAvax-EGF, apuntando al valor de esta población de agotamiento inmune como un posible biomarcador que permitiría identificar los pacientes con mayor beneficio de supervivencia al emplear esta vacuna terapéutica.

Otra evidencia del impacto inmunorestaurador de la BT previo al uso de CIMAvax-EGF, correspondió con el incremento de la proporción de pacientes vacunados clasificados como buenos respondedores al concluir la fase de inducción (primeras 4 inmunizaciones) de la vacuna, en este caso, más del 84 % de los pacientes. Estos resultados comparan favorablemente respecto a los reportados en estudios previos, como el ensayo clínico fase III y al publicado por Popa y colaboradores, en los que se reportó un 56 % y 72 % de buenos respondedores respectivamente, en este mismo momento del esquema de inmunización. <sup>(15,22)</sup>

El análisis de la supervivencia de los pacientes que recibieron BT previo a la vacuna CIMAvax-EGF como terapia de mantenimiento de cambio después de la quimioterapia basada en platinos, compara favorablemente con el reportado por Charalambous y colaboradores con el empleo de pembrolizumab como terapia de mantenimiento de cambio en pacientes CPCNP metastásico y con los resultados obtenidos en el ensayo clínico fase III de la vacuna CIMAvax-EGF como monoterapia en esquema de mantenimiento de cambio después de quimioterapia. <sup>(12,15,23,24)</sup> Estos hallazgos sugieren que la restauración inmunológica que se logra con el empleo de la terapia secuencial Biomodulina T-CIMAvax-EGF promueve que los pacientes con cáncer de pulmón avanzado respondan mejor a esta inmunoterapia oncológica.

## Conclusiones

En resumen, este trabajo nos aproxima a la estrecha relación entre los marcadores de inflamación sistémica e in-

munosenescencia en el contexto de la enfermedad tumoral y los tratamientos quimioterapéuticos. Confirma el efecto deletéreo de la quimioterapia sobre el sistema inmune y aporta las primeras evidencias sobre su reversibilidad al emplear el factor tímico Biomodulina T. Adicionalmente, se corrobora la utilidad de las combinaciones terapéuticas en el contexto del cáncer, en este caso en particular al emplear la combinación secuencial de BT y CIMAvax-EGF que genera una potenciación de la respuesta inmune específica anti-EGF y un beneficio en la supervivencia de los pacientes tratados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dama E, Melocchi V, Dezi F *et al.* An Aggressive Subtype of Stage I Lung Adenocarcinoma with Molecular and Prognostic Characteristics Typical of Advanced Lung Cancers. *Clin Cancer Res.* 2017 Jan 1;23(1):62-72. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-3005.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-49. DOI: 10.3322/caac.21660.
3. Bess Constantén S Anuario Estadístico de Salud de Cuba. *Rev Méd Electrón [Internet].* 2020 [citado 14 feb 2024];38(5). Disponible en: <https://temas.sld.cu/estadisticassalud/2021/08/11/anuario-estadistico-de-salud-2020/>
4. Amaro-Cano M. El envejecimiento poblacional en cuba, desde el prisma de la epidemiología social y la ética. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba [Internet].* 2017 [citado 17 Feb 2024]; Disponible en: <https://revistaccuba.sld.cu/index.php/revacc/article/view/340>
5. Acosta LF. Mejoran los indicadores de salud y crece la esperanza de vida. *Granma [internet].* [citado 17 feb 2024] Disponible en: <https://www.granma.cu/todo-salud/2017-12-29/mejoran-los-indicadores-de-salud-y-crece-la-esperanza-de-vida-29-12-2017-00-12-01>
6. Franceschi C, Bonafé M, Valensin S *et al.* Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2000 Jun;908:244-54. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x.
7. Fulop T, Larbi A, Dupuis G *et al.* Immunosenescence and Inflamm-Aging As Two Sides of the Same Coin: Friends or Foes? *Front Immunol.* 2018 ene 10;8:1960. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01960.
8. Nevalainen T, Autio A, Kummola L *et al.* CD27- IgD- B cell memory subset associates with inflammation and frailty in elderly individuals but only in males. *Immun Ageing.* 2019 ago 13;16:19. DOI: 10.1186/s12979-019-0159-6.
9. Saavedra D, García B, Lorenzo-Luaces P, *et al.* Biomarkers related to immunosenescence: relationships with therapy and survival in lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2016 ene;65(1):37-45. DOI: 10.1007/s00262-015-1773-6.
10. Ottonello S, Genova C, Cossu I *et al.* Association Between Response to Nivolumab Treatment and Peripheral Blood Lymphocyte Subsets in Patients With Non-small Cell Lung Cancer. *Front Immunol.* 2020 feb 7;11:125. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00125.
11. Saavedra D, Fuertes SA, Suárez GM *et al.* Biomodulina T partially restores immunosenescent CD4 and CD8 T cell compartments in the elderly. *Exp Gerontol.* 2019 sep;124:110633. DOI: 10.1016/j.exger.2019.110633.
12. Saavedra D, Neningen E, Rodriguez C *et al.* CIMAvax-EGF: Toward long-term survival of advanced NSCLC. *Semin Oncol.* 2018 ene;45(1-2):34-40. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2018.04.009.
13. García B, Neningen E, de la Torre A *et al.* Effective inhibition of the epidermal growth factor/epidermal growth factor receptor binding by anti-epidermal growth factor antibodies is related to better survival in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with the epidermal growth factor cancer vaccine. *Clin Cancer Res.* 2008 feb 1;14(3):840-6. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1050.
14. Lambert PC, Royston P. Further Development of Flexible Parametric Models for Survival Analysis. *Stata J.* 2009; 9(2):265-90. DOI: 10.1177/1536867X0900900206
15. Rodriguez PC, Popa X, Martínez O *et al.* A Phase III Clinical Trial of the Epidermal Growth Factor Vaccine CIMAvax-EGF as Switch Maintenance Therapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 2016 ago 1;22(15):3782-90. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0855.
16. Chang CH, Hsiao CF, Yeh YM *et al.* Circulating interleukin-6 level is a prognostic marker for survival in advanced nonsmall cell lung cancer patients treated with chemotherapy. *Int J Cancer.* 2013 May 1;132(9):1977-85. DOI: 10.1002/ijc.27892.
17. Larbi A, Fulop T. From "truly naïve" to "exhausted senescent" T cells: when markers predict functionality. *Cytometry A.* 2014 Jan;85(1):25-35. DOI: 10.1002/cyto.a.22351.
18. Meeuwse JAL, van Duijvenvoorde A, Gohar A *et al.* High Levels of (Un)Switched Memory B Cells Are Associated With Better Outcome in Patients With Advanced Atherosclerotic Disease. *J Am Heart Assoc.* 2017 sep 7;6(9):e005747. DOI: 10.1161/JAHA.117.005747.
19. Dorshkind K, Swain S. Age-associated declines in immune system development and function: causes, consequences, and reversal. *Curr Opin Immunol.* 2009 ago;21(4):404-7. DOI: 10.1016/j.coi.2009.07.001.
20. Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E, Signer RA. The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nat Rev Immunol.* 2009 ene;9(1):57-62. DOI: 10.1038/nri2471.
21. Raju S, Joseph R, Sehgal S. Review of checkpoint immunotherapy for the management of non-small cell lung cancer. *Immunotargets Ther.* 2018 jul 31;7:63-75. DOI: 10.2147/ITT.S125070.
22. Cetin B, Bilgetekin İ, Ozet A. Current uses of check inhibitors in the fight against advanced and/or metastatic lung cancer: will immunotherapy overcome chemotherapy? *Curr Probl Cancer.* 2019 feb;43(1):43-53. DOI: 10.1016/j.currproblcancer.2018.07.008.
23. Ferrara R, Mezquita L, Auclin E *et al.* Immunosenescence and immunecheckpoint inhibitors in non-small cell lung cancer patients: Does age really matter? *Cancer Treat Rev.* 2017 nov;60:60-8. DOI: 10.1016/j.ctrv.2017.08.003.
24. Popa X, García B, Fuentes KP *et al.* Anti-EGF antibodies as surrogate biomarkers of clinical efficacy in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer patients treated with an optimized CIMAvax-EGF vaccination schedule. *Oncoimmunology.* 2020 may 25;9(1):1762465. DOI: 10.1080/2162402X.2020.1762465.
25. Kyriacou F, Charalambous H, Stylianou I *et al.* P1.01-12 SWItch Maintenance Pembrolizumab in Patients with Metastatic Non Small Cell Lung Cancer (SWIPE), *J Thorac Oncol* 2018 oct 13;10: S463-4 DOI: 10.1016/j.jtho.2018.08.568.

26.Saavedra D, Crombet T. CIMAvax-EGF: A New Therapeutic Vaccine for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Front Immunol.* 2017 mar 13;8:269. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00269.

---

Recibido: 23/04/2024

Aprobado: 23/05/2024

---

#### Conflictos de intereses

No existen conflictos de interés en relación con la investigación que se presenta

#### Contribuciones de los autores

Conceptualización: Danay Saavedra Hernández, Gisela María Suárez, Ana Laura Añé Kourí, Agustín Lage Dávila

Curación de datos: Danay Saavedra Hernández, Gisela María Suárez, Ana Laura Añé Kourí, Patricia Lorenzo-Luaces Alvarez

Investigación: Danay Saavedra Hernández, Gisela María Suárez, Ana Laura Añé Kourí, Amnely Gonzalez Morera, Karla Pereira Yáñez, Mauricio Catalá Ferrer, Yadira Pera, Susana Portela, Nuris Ledón Naranjo, Alexa Silva

Administración del proyecto: Ana Laura Añé Kourí

Redacción-borrador original: Danay Saavedra Hernández, Ana Laura Añé Kourí

Redacción-revisión y edición: Danay Saavedra Hernández, Ana Laura

Añé Kourí, Agustín Lage Dávila

#### Financiamientos

Este trabajo fue financiado por el Centro de Inmunología Molecular.

#### Ensayos clínicos

La presente investigación se realizó con pacientes incluidos en 2 ensayos clínicos registrados RPCEC00000358 y RPCE00000205.

#### Cómo citar este artículo

Saavedra Hernández D, Añé Kourí AL, Suárez Formigo GM, Pereira Yáñez K, Catalá Ferrer M, Pea Guerra YE et al. Marcadores de inmunosenescencia e inflamación en pacientes con cáncer de pulmón tratados con quimioterapia, biomodulina T y CIMAvax-EGF. *An Acad Cienc Cuba* [Internet] 2024 [citado en día, mes y año];14(2):e1584. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1584>

El artículo se difunde en acceso abierto según los términos de una licencia Creative Commons de Atribución/Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), que le atribuye la libertad de copiar, compartir, distribuir, exhibir o implementar sin permiso, salvo con las siguientes condiciones: reconocer a sus autores (atribución), indicar los cambios que haya realizado y no usar el material con fines comerciales (no comercial).

© Los autores, 2023.

