



VNIVERSITATĪ VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Medicina

Doctorado en Medicina – Programa de Doctorado 3139

Tesis doctoral

Doctoranda: Teresa Soria Comes

Título: Valoración de parámetros celulares y bioquímicos como marcadores de inmunosenescencia y su relación con variables clínicas en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico diagnosticados en el Hospital Universitario Doctor Peset

Directoras y tutor:

Dra. D^a Inmaculada Maestu Maiques

Prof. D^a Sonia Tarazona Campos

Prof. D. Jesús Luis Prieto Andrés

Depósito: Diciembre 2022

INFORME DIRECTORAS Y TUTOR PARA DEPÓSITO DE TESIS

Codirectoras:

1.- Apellidos y nombre: Inmaculada Maestu Maiques, NIF 24330054X

Departamento/Instituto: Jefa de Servicio de Oncología Médica

Centro: Hospital Universitario Doctor Peset

2.- Apellidos y nombre: Sonia Tarazona Campos, NIF 20815653D

Departamento/Instituto: Departamento de Estadística e Investigación Operativa Aplicadas y Calidad

Centro: Universitat Politècnica de València

Tutor:

Apellidos y nombre: Jesús Luis Prieto Andrés, NIF 12223603T

Departamento/Instituto: Profesor Titular Universitario – Departamento de Medicina

Centro: Universitat de València.

Directoras y tutor, respectivamente, de la tesis doctoral: “Valoración de parámetros celulares y bioquímicos como marcadores de inmunosenescencia y su relación con variables clínicas en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico diagnosticados en el Hospital Universitario Doctor Peset” de Dña. Teresa Soria Comes, estudiante del Programa de Doctorado **3139 Medicina** (RD99/2011) en Medicina

de la Universitat de València, emiten informe FAVORABLE para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: diciembre 2022



Fdo.: Inmaculada Maestu
Maiques

Directora



Fdo.: Sonia Tarazona
Campos

Directora



Fdo.: Luis Prieto
Andrés

Tutor

**ESCUELA DOCTORAL
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

Facultat de Medicina i Odontologia, Av. Blasco Ibañez nº 15, 46010-Valencia, Tel. 963864100 - Fax: 963864173
email: doctorado.medicina@uv.es
Web; www.uv.es/doctoratmedicina

Agraïments

A la doctora Inma Maestu, per la seua capacitat infinita per fer possible tot allò que sembla quasi impossible. Per trobar solucions (on la resta veiem problemes), per iniciar-me en la investigació, animar-me en cada pas i no deixar que caiguera o em rendira. I fonamentalment per ser un exemple diari de constància, justícia i senzillesa com a cap de servei, com a oncòlega i com a persona.

A la professora Sonia Tarazona, que sap treure el millor de les dades, per la seua visió innovadora a l'investigació, i per fer-ho tot amb un somriure. També a Vicent Giner qui va iniciar el projecte al meu costat i va posar a Sonia al meu camí.

Al doctor Luis Prieto, pels seus valuosos consells amb la seua prolongada trajectòria i els seus coneixements en immunologia com a professor de la Universitat de València.

A Amparo i a Mar, que em van regalar el seu temps fent les tècniques de citometria de fluxe, em van ensenyar tot el que necessitava i van col·laborar per la seua passió investigadora. I a Pepa, qui em va ensenyar amb paciència tot el que sé d'interpretació de citometria. A elles els dec tot el treball d'investigació i haver pogut arribar fins ací.

A Daniel Almenar, qui va ser el primer en mostrar-me que els millors líders d'un grup són propers i humans; i sobretot, a

plantejar-me sempre que prenga una decisió, si ho estic fent amb trellat.

A Àngels, Rebeca, Santi, Vicente, David, Irene, Javi, Maria, Helena, Sergio, David, Ana i Inés. Als meus residents majors per cuidar-me sempre i ser un exemple a seguir en els meus inicis en l'oncologia. En especial a Vicente, que des del primer moment em va animar a publicar, a investigar i a iniciar un projecte tan gran com és una tesi doctoral. I encara avui a dia, escolta les meues penes i em dóna llum quan em desanime. I també als meus residents xicotets, per la sort que tinc en vore créixer la nostra “família oncològica”, i poder aprendre de cadascun d’ells.

A Miguel, el meu referent en l'oncologia, tant per la seua professionalitat com pel tracte exquisit que té per a cadascú de nosaltres i per als pacients. A Mònica, per la seua presència permanent i silenciosa, sempre atenta a tot allò que m’ha angoixat, per escoltar-me, donar-me la mà o el consell que necessitava.

A tot el servei d’oncologia de l’Hospital Universitari Doctor Peset. Per la seua paciència en els meus altibaixos durant el llarg procés de realització d’aquest treball d’investigació. Per les seues veus d’ànim, i sobretot perquè gràcies la seu acompanyament i el treball en equip, una feina com la nostra, que de vegades és difícil, resulta molt més senzilla.

També al servei d'oncologia i a tants altres companys de l'Hospital Universitari de La Ribera, perquè em van intentar fer fàcil compaginar la feina amb el desenvolupament de la tesi doctoral, i perquè al seu costat he crescut molt professionalment. I al servei d'oncologia de l'Hospital Verge dels Liris, on primer em van acollir en acabar la residència i em vaig sentir una més des del primer dia.

A Ana, Diana, Ester i Thais, que m'acompanyen en totes les preocupacions; per la sort que tinc de que puguem riure i plorar juntes sempre que faça falta. I a totes les meues amigues i amics fora i dins de la medicina, que tantes vegades m'han sentit dir "encara estic fent la tesi" i m'han animat a seguir endavant.

I per últim, a la meua família. Als meus pares que em donen suport en cada pas que done per molt arriscat que siga. Al meu germà, amb qui compartisc tantes coses fora de l'oncologia, i sense el qual no seria la persona que sóc ara mateix. A la meua iaia, qui sempre m'anima a treballar molt i a descansar també. Als meus oncles i als meus cosins (de sang i polítics). En especial a Roser, la meua cosina bessona, i filòlega i editora de capçalera. No podria somiar amb una família que es poguera estimar tant com nosaltres. A Llum, Heura i Laia, per l'amor que em donen, fins i tot quan els dic que "no em puc quedar, demà treballe i he de fer tesi".

I per damunt de tot, als pacients i a les seues famílies, perquè sense ells qualsevol projecte d'investigació mancaria de sentit.

ÍNDICE

Resumen	18
Abreviaturas	27
1. Introducción.....	32
1.1. El sistema inmunológico	32
1.1.1. El sistema inmune innato	33
1.1.1.1. <i>Moléculas de reconocimiento de microorganismos en el sistema inmune innato.....</i>	<i>34</i>
1.1.1.2. <i>Células del sistema inmune innato.....</i>	<i>40</i>
1.1.1.3. <i>La microbiota.....</i>	<i>57</i>
1.1.1.4. <i>Capacidad de entrenamiento del sistema inmune innato.....</i>	<i>61</i>
1.1.2. El sistema inmune adaptativo.....	62
1.1.2.1. <i>Linfocitos T.....</i>	<i>63</i>
1.1.2.2. <i>Linfocitos B.....</i>	<i>74</i>
1.2. El envejecimiento fisiológico.....	77
1.2.1. Biomarcadores del envejecimiento	83
1.3. El envejecimiento a nivel celular y molecular	85
1.4. Inmunosenescencia.....	88
1.4.1. Definición	88
1.4.2. Marcadores de inmunosenescencia.....	90
1.4.2.1. <i>Cambios en la inmunidad innata con la edad</i>	<i>92</i>
1.4.2.2. <i>Cambios en la inmunidad adaptativa con la edad... </i>	<i>96</i>
1.4.3. Factores moduladores en el desarrollo de inmunosenescencia	104
1.4.3.1. <i>Papel de la infección por citomegalovirus (CMV)..</i>	<i>105</i>

1.4.3.2. <i>Influencia del estado nutricional y el estilo de vida en el sistema inmune</i>	106
1.4.4. Implicaciones de la inmunosenescencia	109
1.5. Envejecimiento, sistema inmune y cáncer	112
1.6. Impacto del sistema inmune en el cáncer de pulmón	117
1.7. Justificación del estudio	119
2. Hipótesis y objetivos	123
2.1. Hipótesis	123
2.2. Objetivos	124
2.2.1. Objetivo primario	124
2.2.2. Objetivos secundarios	124
3. Material y métodos	127
3.1. Ámbito del estudio	127
3.2. Población del estudio	128
3.2.1. Criterios de inclusión	128
3.2.2. Criterios de exclusión	129
3.2.3. Tamaño de la muestra	129
3.2.4. Población final del estudio	132
3.3. Diseño del estudio	133
3.4. Variables del estudio	134
3.4.1. Variables demográficas	134

3.4.2. Hábitos tóxicos.....	135
3.4.3. Características clínicas de los pacientes	135
3.4.3.1. Variables de la situación funcional (todos los pacientes).....	136
3.4.3.2. Variables de la valoración geriátrica integral (pacientes de 70 años o más).....	137
3.4.4. Características del tumor.....	141
3.4.5. Variables analíticas bioquímicas.....	142
3.4.5.1. Variables nutricionales	142
3.4.5.2. Variables inflamatorias.....	142
3.4.6. Variables analíticas hematológicas	143
3.4.6.1. Parámetros básicos del hemograma.....	143
3.4.6.2. Poblaciones linfocitarias básicas.....	143
3.4.7. Variables analíticas hematológicas específicas	143
3.4.7.1. Subpoblaciones de linfocitos T $\alpha\beta$	143
3.4.7.2. Subpoblaciones de linfocitos T $\gamma\delta$	145
3.4.7.3. Clasificación de células dendríticas	146
3.4.8. Variables serológicas	147
3.5. Análisis mediante citometría de flujo	147
3.5.1. Obtención de las muestras.....	147
3.5.2. Flujo de trabajo	147
3.5.3. Procesado de las muestras para citometría de flujo.....	148
3.5.3.1. Protocolo en los tubos DuraClone T y TCR	149
3.5.3.2. Protocolo en los tubos DuraClone de células dendríticas.....	150

3.5.3.3. <i>Particularidades del procesado del tubo DuraClone de células T reguladoras</i>	151
3.5.4. Análisis de la citometría de flujo	154
3.5.4.1. <i>Fundamentos de la citometría de flujo</i>	154
3.5.4.2. <i>Análisis de los datos obtenidos mediante citometría de flujo</i>	156
3.6. Metodología estadística	170
3.6.1. Imputación de valores faltantes	170
3.6.2. Relaciones bivariantes entre variables	171
3.6.2.1. <i>Test de Kruskal-Wallis</i>	171
3.6.2.2. <i>Coeficiente de correlación de Spearman</i>	172
3.6.2.3. <i>Coeficiente V de Cramér</i>	172
3.6.3. Relaciones multivariantes: PCA	173
3.6.4. Relación de la edad con variables linfocitarias	176
3.6.5. Agrupación de pacientes según sus perfiles inmunológicos	177
3.6.5.1. <i>Análisis “clustering”</i>	178
3.6.5.2. <i>Caracterización de los “clusters” obtenidos: PLS-DA</i>	179
3.6.5.3. <i>Relación de los “clusters” con el resto de variables</i>	180
3.7. Aspectos éticos	181
4. Resultados	183
4.1. Análisis exploratorio de la muestra	183
4.1.1. Variables demográficas	184
4.1.1.1. <i>Edad y sexo</i>	184

4.1.1.2. Hábito tabáquico	184
4.1.2. Variables clínicas	185
4.1.2.1. ECOG.....	185
4.1.2.2. Variables clínicas nutricionales	185
4.1.2.3. Comorbilidad	188
4.1.2.4. Valoración social y emocional del grupo global de pacientes	190
4.1.2.5. Valoración geriátrica integral.....	193
4.1.3. Variables del tumor	200
4.1.3.1. Histología	200
4.1.3.2. Estadio tumoral	201
4.1.3.3. Estatus de PD-L1	202
4.1.4. Variables analíticas	203
4.1.4.1. Variables bioquímicas nutricionales e inflamatorias	204
4.1.4.2. Parámetros básicos del hemograma.....	205
4.1.4.3. Poblaciones linfocitarias básicas.....	205
4.1.4.4. Poblaciones linfocitarias específicas.....	206
4.1.4.5. Variables serológicas	208
4.2. Relación entre variables	208
4.2.1. Relación bivalente de variables clínicas.....	209
4.2.1.1. Relación entre variables clínicas entre sí.....	210
4.2.1.2. Relación de las variables clínicas con variables analíticas	212
4.2.2. Relación bivalente entre variables analíticas y con la edad	228
4.2.2.1. Relación entre variables analíticas nutricionales e inflamatorias	230

4.2.2.2. Relación entre variables analíticas nutricionales y hematológicas inmunológicas	230
4.2.2.3. Relación entre variables analíticas inflamatorias bioquímicas y celulares	230
4.2.2.4. Relación entre poblaciones linfocitarias entre sí y con la edad.....	231
4.2.2.5. Relación entre poblaciones linfocitarias y la infección por CMV	235
4.2.3. Relación multivariante entre variables clínicas y analíticas: análisis de componentes principales (PCA)	238
4.2.3.1. Población global	239
4.2.3.2. Población anciana	251
4.2.3.3. Pacientes en los que se analizaron las subpoblaciones de linfocitos T reguladores	261
4.2.4. Estudio específico de la relación entre la edad y los puntos de corte de variables linfocitarias	264
4.3. Agrupación de los pacientes en función de las características del sistema inmunológico: "clustering"	269
4.3.1. "Clustering"	270
4.3.2. Relación entre los "clusters" y variables clínicas y parámetros inflamatorios	276
4.3.2.1. Muestra general	276
4.3.2.2. Población anciana	284
5. Discusión.....	294
5.1. Análisis exploratorio de la muestra	294
5.1.1. Variables demográficas	294
5.1.1.1. Edad y sexo.....	294

5.1.1.2. Hábito tabáquico	294
5.1.2. Variables clínicas	295
5.1.2.1. ECOG.....	295
5.1.2.2. Variables clínicas nutricionales	296
5.1.2.3. Comorbilidad	297
5.1.2.4. Valoración social y emocional del grupo global de pacientes	298
5.1.2.5. Valoración geriátrica integral.....	302
5.1.3. Variables del tumor	305
5.1.4. Variables analíticas	306
5.2. Relación entre variables	311
5.2.1. Relación entre variables clínicas	311
5.2.2. Relación entre variables inmunológicas e inflamatorias	314
5.2.3. Relación entre variables clínicas e inmunológicas y/o inflamatorias.....	318
5.2.3.1. Análisis de la edad	318
5.2.3.2. Análisis del sexo.....	323
5.2.3.3. Análisis de los parámetros pronósticos clásicos en cáncer de pulmón.....	324
5.2.3.4. Análisis de otras características del tumor.....	328
5.2.3.5. Análisis de la situación emocional y social.....	329
5.2.3.6. Análisis específico de la población anciana incluyendo la valoración geriátrica integral	331
5.2.4. Relación entre la valoración nutricional y parámetros inflamatorios e inmunológicos.....	336

5.2.5. <i>Relación entre la infección por CMV y parámetros inflamatorios e inmunológicos</i>	341
5.3. <i>Asociación de los patrones inmunológicos obtenidos mediante “clustering” con parámetros clínicos</i>	343
5.4. <i>Fortalezas, debilidades y oportunidades</i>	347
5.4.1. <i>Fortalezas del estudio</i>	347
5.4.2. <i>Limitaciones del estudio</i>	349
5.4.3. <i>Oportunidades</i>	352
6. <i>Conclusiones</i>	355
7. <i>Contribuciones científicas derivadas de la tesis doctoral</i>	359
7.1. <i>Comunicaciones científicas en congresos nacionales e internacionales</i>	359
7.1.1. <i>Comunicaciones en congresos internacionales</i>	359
7.1.2. <i>Comunicaciones en congresos nacionales</i>	365
7.2. <i>Publicaciones en revistas científicas</i>	368
8. <i>Referencias</i>	370
9. <i>Lista de tablas y de figuras</i>	438
10. <i>Anexos</i>	455
10.1. <i>Resolución del comité ético de investigación clínica (CEIC) del Hospital Universitario Doctor Peset</i>	455

10.2. Hoja de información a los pacientes y consentimiento informado.....	457
10.3. Escalas de valoración funcional en el paciente joven	462
10.4. Escalas de valoración geriátrica integral	466

RESUMEN

Resumen

Introducción

Existe un creciente conocimiento sobre los cambios que se producen en el sistema inmune con la edad en la población sana. En cambio, estos cambios son poco conocidos en los pacientes con cáncer. En concreto, en cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) ha habido un gran desarrollo de terapias inmunológicas, tanto en la enfermedad avanzada como en estadios más precoces. Para realizar un uso óptimo de dichas terapias, resulta de gran interés conocer las características basales del sistema inmunológico así como el grado de inflamación sistémica de los pacientes diagnosticados de CPNM y su posible correlación con variables clínicas. Las características de interés serían, en primer lugar, la edad (puesto que es el parámetro más estudiado en población no oncológica), pero también la comorbilidad, situación funcional, estado nutricional, características del tumor, y la presencia de infección crónica por citomegalovirus (CMV), entre otras.

Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo es estudiar los principales parámetros analíticos inmunitarios descritos como marcadores de inmunosenescencia en los pacientes diagnosticados de CPNM comprobar si existen alteraciones significativas con la edad. Los objetivos secundarios se resumen

en: examinar la posible relación entre dichos marcadores y de *inflammaging* con características clínicas, sociodemográficas y del tumor; valorar la posible correlación de otras poblaciones celulares con variables clínicas y analíticas (células dendríticas, linfocitos $\gamma\delta$); analizar si el estado nutricional, factores funcionales, sociales y psicológicos (así como otros de la valoración geriátrica integral (VGI) en población anciana) tienen influencia sobre los cambios que se producen en el sistema inmune y; determinar si la infección por CMV tiene influencia en los cambios que se producen en el sistema inmune.

Metodología

El trabajo de investigación que nos ocupa se trata de un estudio transversal, descriptivo y analítico con inclusión prospectiva de los pacientes diagnosticados de CPNM entre marzo de 2018 y febrero de 2021 en el Hospital Universitario Doctor Peset (Valencia). Tras la inclusión en el estudio, y previo al inicio de cualquier tratamiento, se realizó la valoración clínica completa de los pacientes, incluyendo su situación social, funcional, nutricional y emocional (y en el caso de los pacientes de 70 años o más, la VGI). También se programó la extracción analítica completa, incluyendo bioquímica, hematimetría, y microbiología (serología de citomegalovirus). Se realizó la extracción de otro tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante para realizar el estudio posterior mediante citometría de flujo de las poblaciones linfocitarias y de células dendríticas. En cuanto al análisis estadístico, se realizó el

análisis descriptivo de la muestra, tanto de la población global, como de los dos grupos de edad (jóvenes y ancianos), con punto de corte en 70 años. La correlación entre variables se estudió en primer lugar de forma univariable: el análisis de la asociación entre variables categóricas, se realizó mediante la V de Cramér; la posible relación entre variables categóricas y numéricas se calculó mediante el test de Kruskal Wallis; y para determinar la asociación entre variables numéricas se empleó el coeficiente de correlación de Spearman. Se realizó también el análisis de componentes principales (PCA), de carácter multivariable, para analizar las relaciones entre variables correspondientes a poblaciones celulares (continuas) y otras variables clínicas. Finalmente, se emplearon técnicas de *clustering* para la obtención de patrones inmunológicos con las variables hematológicas básicas, las poblaciones linfocitarias y de células dendríticas en números absolutos. Tras estandarización de los datos se obtuvo el número óptimo de *clusters*, sobre los cuales se estudiaron las posibles diferencias en otras variables clínicas y analíticas mediante los tests de Kruskal Wallis (para variables continuas) o test exacto de Fisher (para variables categóricas).

Resultados

Se incluyeron en el estudio 131 pacientes, con una mediana de edad de 68 años, un predominio de los pacientes varones (77.9%) y un 45% de pacientes del grupo de ancianos (70 años o más). En cuanto a las características del tumor, la histología

predominante fue el adenocarcinoma (67.2%) y los estadios avanzados (53.4%) y localmente avanzados (36.6%).

Casi un 70% de los casos presentaban buena situación funcional (ECOG 0-1). En cuanto a la valoración nutricional, un 34.4% de pacientes presentaban una pérdida de peso $\geq 5\%$ en los últimos 6 meses; el 32.8% se clasificaron como caquéticos y un 45% tenían riesgo o criterios de desnutrición en la evaluación con el *mini nutritional assessment* (MNA).

Centrándonos en la población anciana, aproximadamente un 70% de los pacientes tuvieron un test de *screening* alterado. De todos modos, todos nuestros pacientes fueron valorados mediante VGI.

La edad no mostró correlaciones clínicamente significativas con los niveles de las distintas poblaciones celulares ni parámetros inflamatorios. Ante estos hallazgos, se decidió buscar el punto de corte óptimo de edad que permitiera maximizar la discrepancia entre dos grupos de cada una de las poblaciones linfocitarias, para determinar si existía un punto de corte común, que no pudo ser hallado. En cambio, observamos que, en el caso de los linfocitos T CD8⁺ el punto de corte fue más alto para la mayoría de subpoblaciones (alrededor de 75-80, salvo en los linfocitos inmaduros, que es de 67); mientras que en el caso de los linfocitos T CD4⁺, estuvo en torno a 65 años para la mayoría de subpoblaciones. El sexo femenino se asoció en el análisis univariable con niveles mayores de linfocitos inmaduros CD4⁺ y CD8⁺ (p-valores <0.01).

En cuanto a la situación funcional según la escala ECOG, en los pacientes con situación funcional deteriorada, se hallaron niveles altos de LDH, PCR, IL-6 y neutrófilos; y niveles bajos de proteínas, albúmina y linfocitos (p-valor <0.05). En cambio, los pacientes con ECOG más bajo presentaron niveles más altos de linfocitos T, CD4⁺ (p-valor 0.028) y CD8⁺ (p-valor 0.032), sobre todo a expensas de los linfocitos CD4⁺ centrales de memoria y efectores de memoria (p-valor 0.0461 y 0.002) y T $\gamma\delta$ V δ 1-V δ 2⁺ (p valor 0.028).

La situación nutricional mostró un perfil similar al ECOG, de modo que los pacientes con estado nutricional normal tenían niveles más altos de albúmina, hemoglobina y linfocitos (p-valor <0.05) y más bajos de marcadores inflamatorios clásicos (p-valor <0.001); esto se confirmó en el análisis PCA. En cambio, los pacientes con caquexia presentaban niveles altos de linfocitos B y bajo de linfocitos CD8⁺ totales y CD4⁺ maduros.

El estadio tumoral sólo pudo relacionarse con los valores de células dendríticas, que se mostraron menores en pacientes con estadios más avanzados (p-valor <0.05; salvo en los pacientes con estadio I). Estos datos se ratificaron en el PCA.

Respecto a los pacientes ancianos, la VGI mostró que los pacientes con dependencia para actividades instrumentales exhibían menor ratio CD4⁺/CD8⁺, linfocitos T reguladores y $\gamma\delta$ V δ 1-V δ 2⁺. Además los pacientes con sospecha de depresión presentaron niveles elevados de linfocitos CD8⁺ exhaustos; mientras que los pacientes con situación social deteriorada (escala de Gijón) tenían menores niveles de linfocitos CD8⁺

maduros. La sospecha de deterioro cognitivo medido con el test de Pfeiffer, se relacionó con niveles más bajos de linfocitos T CD8⁺ centrales de memoria y reguladores en el análisis univariable; en cambio, en el PCA, la alteración en el mini-mental test de Lobo, fue la única variable clínica de la VGI que se relacionó con niveles más bajos de linfocitos CD8⁺ (y casi todas sus subpoblaciones). Los individuos ancianos con limitación funcional moderada o severa presentaban niveles altos de IL-6 y PCR. Por último, sólo la clasificación por la escala SIOG1 fue capaz de detectar diferencias en los linfocitos T $\gamma\delta$ V δ 1⁺V δ 2⁺, de modo que los pacientes *fit* presentan valores absolutos más elevados.

La variable más consistente con el desarrollo de los parámetros de inmunosenescencia fue la infección por CMV, de modo que la presencia de IgG de CMV se relacionó en esta muestra con niveles más altos de todas las subpoblaciones linfocitarias CD4⁺ y CD8⁺ con mayores estadios madurativos tanto en el análisis univariable como en el PCA.

Para finalizar, se realizaron técnicas estadísticas de *clustering* para la obtención de diferentes patrones inmunológicos, con lo que se determinaron 9 grupos en función de sus características inmunológicas, y a partir de ellos se analizaron las posibles características clínicas diferenciales. El *cluster* más destacable fue el 6, formado íntegramente por pacientes <70 años, con un claro patrón proinflamatorio (presencia de neutrofilia, trombofilia y linfopenia de todas las subpoblaciones), y éste se correlacionó con un ECOG deteriorado, bajos niveles de albúmina y niveles altos de PCR e IL-6. En cambio, en el *cluster* 1, que se

caracterizaba por niveles más altos de linfocitos T $\gamma\delta$ $V\delta 1^+V\delta 2^-$, $CD4^+$ efectores de memoria y linfocitos B predominaban en pacientes jóvenes con ECOG 0-1. Por último, el *cluster* 8 destacó por la predominancia de linfocitos $CD4^+$ maduros y TEMRA y se correlacionó con la agrupación por edad y ECOG, siendo estos pacientes mayoritariamente ancianos con buena situación funcional (ECOG 0-1).

Conclusiones

La edad en sí misma no puede considerarse el factor principal para el desarrollo de la inmunosenescencia en los pacientes con CPNM; además, los cambios del sistema inmune, se producen en momentos distintos en las diferentes poblaciones linfocitarias, ocurriendo de forma más precoz en los linfocitos $CD4^+$. El sexo se relaciona con los niveles de linfocitos inmaduros. El estado funcional deteriorado y una pobre situación nutricional se asocian a parámetros inflamatorios; mientras que un buen estado funcional se correlaciona con niveles mayores de linfocitos $CD8^+$ totales, $CD4^+$ centrales de memoria y efectores de memoria y $V\delta 1^+V\delta 2^+$. En cambio, el estadio tumoral se relaciona solamente con niveles de células dendríticas. En los ancianos los niveles de linfocitos T reguladores son más bajos en pacientes con dependencia para actividades instrumentales, con limitación moderada-severa para la movilización y con deterioro cognitivo. También los pacientes con deterioro cognitivo exhiben niveles más bajos de linfocitos $CD8^+$. En cambio, la situación emocional (sobre todo en pacientes

jóvenes) no se correlaciona con su situación inmunológica ni con el estatus inflamatorio. Por último, infección por CMV es el factor más consistente en el desarrollo de los cambios de la inmunosenescencia, y se relaciona con niveles elevados de todas las poblaciones linfocitarias maduras en los pacientes con CPNM.

ABREVIATURAS

Abreviaturas

ABVD: actividades básicas de la vida diaria.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AIVD: actividades instrumentales de la vida diaria.

AMPs: péptidos antimicrobianos.

APD: fotodiodos de avalancha.

ARN: ácido ribonucleico

ASC: *apoptosis associated speck-like protein*.

ATP: adenosín trifosfato.

BAFF: factor activador de las células B.

BCR: receptor de superficie de célula B (*B cell receptor*).

BHE: barrera hematoencefálica.

CIRS-G: *cumulative illness rating scale for geriatrics*.

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad.

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad.

CMV: citomegalovirus.

CPA: células presentadoras de antígeno.

CPNM: cáncer de pulmón no microcítico.

DAMPs: patrones moleculares asociados al daño (*damage-associated molecular patterns*).

DC: células dendríticas.

DM: diabetes mellitus.

ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

Foxp3: *forkhead box P3*.

HDL: *high density lipoprotein*.

IFN: interferón.

Ig: inmunoglobulina.

Ig: inmunoglobulina.

IGF-1: factor de crecimiento insulina-like 1.

IL: interleuquina.

ILC: células linfoides innatas (*innate lymphoid cells*).

IRP: *Immune risk profile*.

KIR: *killer cell immunoglobulin-like receptor*.

L TEMRA: linfocitos efectores de memoria con diferenciación terminal y reexpresión de CD45RA.

LCM: linfocitos centrales de memoria.

LDL: *low density lipoprotein*.

LEM: linfocitos efectores de memoria.

LN: linfocitos inmaduros o *naïve*.

MAPK: proteína-quinasas activadas por mitógeno.

mDC: células dendríticas mieloides o convencionales.

MNA: *mini nutritional assessment*.

NCR: receptores de citotoxicidad natural (*natural cytotoxicity receptors*).

NET: *neutrophilic extracellular traps* o trampas neutrofilicas extracelulares.

NF- κ B: factor nuclear kB.

NK: *Natural Killer*.

NKG2D: receptor activador de NKD grupo 2 miembro D.

NLR: *nucleotide-binding oligomerization domain-like*.

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*).

PBS: tampón fosfato salino o *phosphate buffered saline*.

PCA: análisis de componentes principales o *principal component analysis*.

PCR: proteína C reactiva.

pDC: células dendríticas plasmocitoides.

PMT: tubo fotomultiplicador.

PRRs: receptores de reconocimiento de patrones (*pattern recognition receptors*).

PS: *performance status*.

SNC: sistema nervioso central.

SPPB: *short physical performance battery*.

TCR: receptor de superficie de célula T (*T cell receptor*).

Tfh: T *helper* foliculares.

Th: T *helper*

TLRs: receptores *Toll-like*.

TMB: *tumoral mutational burden*.

TNF: factor de necrosis tumoral.

VGI: valoración geriátrica integral.

WEIRD: Western, educated, industrialized, rich, democratic.

INTRODUCCIÓN

*Si vols ser savi, aprén a interrogar raonablement,
a escoltar amb atenció, a respondre serenament i,
a callar quan no tingues res a dir.*

Johann Kaspar Lavater

1. Introducción

1.1. *El sistema inmunológico*

El entorno en que vivimos está repleto de microorganismos; además, constantemente sufrimos también agresiones internas, por lo que la especie humana (igual que otros seres vivos) requiere para la supervivencia, la existencia de mecanismos de defensa eficaces que mantengan la integridad biológica del organismo.

Para esto, es crucial que el sistema inmune sea capaz de distinguir las moléculas propias del individuo frente a los elementos extraños, y para ello, emplea multitud de moléculas y células. Esta habilidad para distinguir lo propio de lo ajeno está presente en el individuo desde su nacimiento, y va madurando, especialmente durante los primeros años de vida. Pero su modulación es un proceso dinámico, que en realidad, se produce a lo largo de toda la vida [1].

Además, este sistema debe ser capaz de destruir elementos nocivos sin producir destrucción tisular masiva en este proceso. Los elementos del sistema inmunológico se han agrupado en moléculas (que forman la inmunidad humoral) y células (inmunidad celular). Ambos constituyen la defensa inmunológica del individuo, que a nivel teórico actúa en dos fases: en primer lugar, el sistema inmune innato o inespecífico responde de forma rápida ante elementos extraños, mientras que el sistema inmune adaptativo requiere un tiempo para desarrollarse de

forma específica ante el elemento que inició la respuesta inmunitaria [2]. No obstante, en la práctica, todos los componentes están interrelacionados y responden de forma coordinada ante una agresión.

1.1.1. El sistema inmune innato

El sistema inmune innato ha sido descrito como el conjunto de elementos que producen una respuesta inmunológica rápida tras un ataque, que forman parte del individuo desde su nacimiento y actúan de forma inespecífica frente a microorganismos u otras agresiones [3, 4]. Muchos de los integrantes de este sistema se encuentran en la mayoría de organismos pluricelulares y por tanto son elementos conservados a lo largo de la evolución de las especies. Se trata de un componente crucial para la supervivencia del individuo, ya que además de suponer la primera línea de defensa en el contexto de una infección, posee mecanismos para la regulación de la inflamación y el mantenimiento de la homeostasis inmunológica. Además, la activación del sistema inmune inespecífico es indispensable para iniciar la respuesta específica.

El primer impedimento para la penetración de microorganismos en el organismo son las barreras físicas, compuestas por las uniones de las células epiteliales en la piel y las superficies mucosas, así como el moco y los cilios que poseen algunas de las células del sistema respiratorio [5, 6]. A

estos elementos también contribuyen los cambios de pH que se producen a lo largo del tracto gastrointestinal.

A continuación se revisarán los principales integrantes del sistema inmune inespecífico, tanto moleculares y celulares propios del individuo, como la microbiota, cuyo papel clave en la defensa del individuo contra microorganismos patógenos se ha estudiado exhaustivamente durante los últimos años [7].

1.1.1.1. Moléculas de reconocimiento de microorganismos en el sistema inmune innato

Uno de los factores principales que componen el sistema inmune inespecífico son un grupo de proteínas llamado receptores de reconocimiento de patrones (*pattern recognition receptors, PRRs*), que son capaces de unirse a dos tipos de moléculas: patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns, PAMPs*) y patrones moleculares asociados al daño (*damage-associated molecular patterns, DAMPs*) [8].

Los PAMPs son moléculas presentes solamente en los microorganismos, son distintos y característicos para cada grupo de microorganismos y participan tanto en la patogenicidad como en la integridad y la supervivencia de dichos seres vivos. Uno de los PAMPs más estudiados es el lipopolisacárido, presente en la membrana de todas las bacterias gramnegativas y que es reconocido por el receptor *Toll-like 4*. En cambio, los DAMPs, también conocidos como alarminas, son moléculas originadas por la destrucción de células del huésped

procedentes su núcleo, mitocondrias o el citosol [9]. La unión de cualquiera de estas dos moléculas con su ligando desencadenan señales proinflamatorias muy potentes en el interior celular.

Los PRRs se dividen en dos grupos principales en función de su localización: PRRs circulantes y celulares.

PRRs circulantes:

Son proteínas del sistema del complemento, péptidos antimicrobianos, oligosacáridos antibacterianos, colectinas, lectinas y pentraxinas. De entre éstas, destacan el sistema del complemento, los péptidos antimicrobianos y las pentraxinas.

- ▶ El sistema del complemento está formado por un conjunto de proteínas solubles y de membrana, cuya activación pone en marcha una cascada inflamatoria muy potente. Las proteínas que forman parte del complemento, se encuentran en forma inactiva, hasta que se ponen en contacto con moléculas de patógenos. De este modo, el complemento puede activarse por tres vías y producir la destrucción directa de microorganismos, la opsonización de los mismos (estimulación de la fagocitosis) o inducir la atracción de quimiocinas (es decir, citoquinas con capacidad quimiotáctica) y reclutamiento de fagocitos [10]. La vía clásica se inicia al unirse la proteína C1q a anticuerpos naturales (no producidos por la respuesta a un patógeno concreto) o pentraxinas asociadas a estructuras de los patógenos; en la vía alternativa, la proteína C3 se une directamente a estructuras de la superficie del

patógeno; y, por último, en la vía de las lectinas, una proteína de unión a carbohidratos, se une a residuos de la superficie del patógeno. Las 3 vías confluyen en el complejo convertasa C5, que genera una anafilotoxina y finalmente, mediante la unión a otras proteínas, el complejo de ataque de membrana, que produce la lisis del microorganismo patógeno [11]. A su vez, las lectinas pueden unirse directamente a las bacterias y alterar su membrana sin la participación del complemento.

- ▶ Por otro lado, los péptidos antimicrobianos (AMPs) se unen a estructuras de membrana de los microorganismos y generan poros en la misma, lo que conduce a la muerte celular. Son cruciales en la protección de las superficies epiteliales (piel y mucosas) así como para la destrucción de los microorganismos fagocitados [12].
- ▶ De entre las pentraxinas, que son una familia de proteínas con alta conservación evolutiva e interespecies, destaca la proteína C reactiva (PCR) [13]. La PCR humana es un pentámero con cinco unidades idénticas y que se une a la fosfocolina de forma dependiente del calcio. A diferencia de lo que ocurre en otras especies (en las que está presente de forma constitutiva), en humanos es sintetizada por el hígado como un reactante de fase aguda, y además, su conformación cambia en ambientes acidóticos, como los que se generan en los lugares donde existe inflamación [14, 15]. Aunque su papel en el contexto de la inflamación a nivel local no estaba claramente establecido, actualmente se sabe que puede promover la

fagocitosis uniéndose a la fracción gamma de la inmunoglobulina G (IgG) de fagocitos, o también a través del complemento, uniéndose a la proteína C1q (y por tanto, activando el complemento por la vía clásica) [16].

PRRs celulares:

Los PRRs celulares están expresados de forma constitutiva en la mayoría de células del sistema inmune innato y también en células presentadoras de antígenos, y tras su activación inducen la movilización de otros PRR. Los más importantes son los receptores *Toll-like* (TLR); pero destacan también los PRRs asociados a fagocitosis y los PRRs intracelulares. A continuación se describirán solamente los más característicos.

- ▶ Los receptores *Toll-like* (TLR) son proteínas transmembrana presentes en las células eucariotas, y por tanto, es también una estructura conservada filogenéticamente a lo largo de la evolución de los invertebrados y vertebrados, e incluso está presente en plantas [17]. En el ser humano se encuentran en muchas células del sistema inmune innato (monocitos, macrófagos, células epiteliales y neutrófilos) y también en células dendríticas, y otras células del sistema inmune adaptativo, entre otras. Éstos, reconocen tanto PAMPs como DAMPs y con su activación, se inicia la transcripción de citoquinas proinflamatorias. Se conocen al menos 11 tipos de TLR humanos [18], aunque el primero en describirse, y el más estudiado es TLR4, que está

expresado de forma constitutiva en muchas células humanas y que se activa ante pequeñas cantidades de lipopolisacárido. Aunque la mayoría de TLRs descritos se sitúan en la membrana, algunos se encuentran en la superficie de endosomas intracelulares.

Los TLR son homólogos al receptor de interleuquina-1 (IL-1) en su dominio intracitoplasmático, y comparten una vía de señalización que induce la transcripción de factores intracelulares como el factor nuclear κ B (NF- κ B), con un papel crucial en la iniciación de la respuesta inflamatoria. Gracias a la expresión de NF- κ B se secretan citoquinas muy potentes (factor de necrosis tumoral (TNF), IL-6 y pro-IL-1- β), moléculas de adhesión celular (como E-selectinas) y moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86). Como se ha descrito, su papel principal es la defensa ante microorganismos, pero los TLRs también participan en la defensa antitumoral, aunque de un modo complejo [19], ya que su expresión es variable, tanto en células tumorales como en las células inmunes del microambiente tumoral, por lo que puede suponer un arma de doble filo, y provocar tanto estimulación de las células inflamatorias para conseguir la erradicación tumoral, como inducir procesos de inflamación crónica y promover la progresión tumoral.

- ▶ Los fagocitos presentan también en su superficie PRRs de membrana relacionados con la fagocitosis. Éstos, al unirse a PAMPs, inician el proceso de fagocitosis, precipitan la secreción de especies reactivas de oxígeno y de fagolisosomas con productos microbicidas [20]. Este es

el caso de los macrófagos, que además, presentan fragmentos de estos microorganismos mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), lo que induce la activación de linfocitos T específicos.

- ▶ Pero además, existen PRRs intracelulares: los receptores con dominio de oligomerización de unión a nucleótido (*nucleotide-binding oligomerization domain-like* (NLRs)) comparten algunas características con los TLR, se activan a través de PAMPs y DAMPs y en función de su dominio efector, se dividen en tres familias: NLRs con dominio de reclutamiento de caspasas, NLRs con dominio pirina y NLRs con dominio BIR. Se conoce como inflammasoma el conjunto organizado de proteínas que contienen NLR con dominio efector de pirina (especialmente NLRP3), junto con la proteína ASC (*apoptosis associated speck-like protein*) [21], cuyo dominio de reclutamiento de la caspasa es capaz de activar la enzima caspasa 1. Esto genera una respuesta proinflamatoria que promueve la muerte celular mediante piroptosis, lo cual puede contribuir a enfermedades crónicas al inducir estados de inflamación crónica [22, 23].
- ▶ Por último, los receptores *RIG-like* (RLRs) se sitúan en el citosol, habitualmente en la membrana de endolisosomas celulares, y reconocen ácidos nucleicos (principalmente RNA vírico) que, de forma análoga a los TLR intracelulares, estimulan la producción de interferón y citoquinas proinflamatorias a través del factor de transcripción NF- κ B [24].

1.1.1.2. Células del sistema inmune innato

Los principales efectores del sistema inmune innato son los neutrófilos, monocitos y macrófagos, aunque no son las únicas células implicadas. Por ejemplo, las plaquetas, eosinófilos, mastocitos y células epiteliales, expresan PRRs y contribuyen a la defensa inmunológica [25]. Por último, las células dendríticas son las principales células presentadoras de antígenos (CPA), que constituyen la vía de intersección entre el sistema inmune inespecífico y el específico [26]. A continuación se revisará el papel de estas células en la inmunidad innata.

Los **neutrófilos** son un subtipo de polimorfonucleares que constituyen los fagocitos más abundantes en el torrente sanguíneo de los humanos (50-70%) y son las primeras células que acuden allí donde se produce un proceso infeccioso o inflamatorio de cualquier tipo [27], tanto para la destrucción de patógenos, como para la eliminación de los elementos generados en el lugar de inflamación. De hecho, la ausencia de neutrófilos genera una inmunodeficiencia severa. La movilización de los neutrófilos a estas localizaciones se produce gracias a agentes quimiotácticos producidos por los leucocitos centinelas presentes en los tejidos y por las células endoteliales cuando entran en contacto con DAMPs o PAMPs; lo que genera un gradiente intravascular quimiotáctico que promueve la migración de los neutrófilos así como un aumento de su activación [28]. Una de estas moléculas es la IL-8 que es secretada por células del sistema inmune innato activadas y células epiteliales [29]. Además, algunos AMPs también inducen la quimiotaxis de los neutrófilos, y los macrófagos y mastocitos

inducen el aumento de permeabilidad de los vasos para facilitar la migración de los neutrófilos.

En el lugar de la infección, los neutrófilos fagocitan los microorganismos opsonizados previamente gracias a la fijación a fragmentos de C3 o a inmunoglobulina G (IgG). Tras la fagocitosis, los microorganismos son eliminados mediante la fusión de los fagosomas llenos de microorganismos con gránulos intracelulares que contienen especies reactivas de oxígeno o defensinas entre otras moléculas microbicidas; además, esta unión activa las proteasas presentes en los fagosomas, lo que contribuye a la destrucción de microorganismos. Por otro lado, en presencia de anticuerpos contra antígenos de células tumorales los neutrófilos pueden lisar estas células mediante citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (del mismo modo que lo hacen las células *Natural Killer* (NK) y los macrófagos) [30]. Lejos de ser la población homogénea que se creía anteriormente, durante la última década se ha descubierto que existen distintos fenotipos de neutrófilos maduros, algunos de los cuales pueden tener funciones incluso inmunosupresoras [31].

Además, en los lugares de infección, los neutrófilos excretan cadenas de cromatina con proteínas antimicrobianas llamadas trampas neutrofílicas extracelulares (*neutrophilic extracellular traps*, NETs), en un proceso denominado NETosis [32]. La función de las NETs es capturar microbios así como proteasas, citoquinas y quimiocinas, y de este modo limitar el daño tisular. Al finalizar el proceso inflamatorio, las células endoteliales finalmente reducen ese gradiente mediante endocitosis de las

citoquinas, lo cual limita el reclutamiento de los neutrófilos. Y, entonces, los neutrófilos mueren mediante apoptosis y son eliminados por macrófagos y células dendríticas. Para reestablecer la homeostasis inflamatoria, las DNAsas junto con los macrófagos tisulares rompen la estructura de las NETs para eliminarlas aunque el mecanismo por el que se realiza la limpieza de las NETs no es del todo conocido [33, 34]. No obstante, cuando las NETs se han producido como respuesta a cristales de colesterol, presente en las placas de ateroscлерosis, las NETs producen el efecto contrario en los macrófagos, induciendo la secreción de citoquinas proinflamatorias.

Aunque estas funciones son las principales que desempeñan los neutrófilos, también pueden ser modulados por la exposición antigénica e incluso migrar a ganglios linfáticos, facilitando la presentación antigénica.

Los **monocitos y macrófagos** son los otros elementos fagocíticos principales de la inmunidad innata y forman parte del sistema mononuclear fagocítico junto con las células dendríticas [35]. Los monocitos se generan en la médula ósea a partir de un progenitor común mieloide y se liberan al torrente sanguíneo, representando aproximadamente el 10% de los leucocitos [36]. Desde aquí, algunos de ellos son reclutados a diferentes tejidos e inician su proceso de maduración para convertirse en macrófagos o bien en células dendríticas; y otros se transforman en monocitos no clásicos [37]. Aunque tradicionalmente se creía que la mayoría de los macrófagos tisulares procedían de la maduración de monocitos circulantes, en realidad, la mayoría de estas células se generan en el embrión y migran en este

momento a los distintos tejidos, de modo que, en el individuo adulto el mantenimiento de los macrófagos proviene principalmente a partir de estos progenitores tisulares que perduran a lo largo de la vida y poseen autosuficiencia para renovarse [38, 39]; y, por tanto, la contribución a la reposición de los macrófagos tisulares por parte de los monocitos, es mínima en condiciones fisiológicas [40, 41]. De todos modos, esto varía en diferentes tejidos, por ejemplo, en aquellos con alta exposición a microbios (lo que supone un bajo grado de inflamación constante), como el intestino, las células derivadas de los monocitos renuevan el compartimento macrofágico en mayor medida, también en condiciones basales. En cambio, en condiciones patológicas, los monocitos se diferencian y son reclutados a los tejidos correspondientes, donde adquieren funciones efectoras y también reparadoras [42].

Los macrófagos son células inmunes de estirpe mieloide, y los principales marcadores de los macrófagos residentes en tejidos son F4/CD80, CD64 o MerTK [43]. Por otro lado, los macrófagos derivados de monocitos tienen una vida media mucho más corta, carecen de estos marcadores, y expresan CD14 y/o CD16; aunque los monocitos, bajo algunas circunstancias también pueden dar lugar a otras poblaciones de macrófagos que pueden ser prácticamente indistinguibles de los macrófagos residentes (en especial, en procesos inflamatorios o en otras condiciones patológicas) [36]. En cada tejido, los macrófagos se diferencian de forma específica, poseen una expresión genómica diferenciada, y reciben un nombre característico: células de Kupffer en el hígado, osteoclastos en

el hueso, células de Langerhans en la epidermis, macrófagos alveolares en el pulmón o la microglía a nivel cerebral [44], por ejemplo; esto sugiere que el microambiente tisular juega un papel muy relevante en la maduración diferencial de cada uno de estos tipos de macrófagos [41, 43].

Las funciones principales de estas células incluyen la inmunovigilancia en los tejidos donde residen, fagocitosis y neutralización de patógenos así como de restos celulares; pero también ejercen funciones reparadoras en la resolución de la inflamación y por último, en la homeostasis de los tejidos donde residen, por ejemplo, mediante el metabolismo del hierro o la eliminación del surfactante pulmonar [44].

A diferencia de las células dendríticas, los macrófagos son células no migratorias, y la mayoría de sus funciones las ejecutan a nivel tisular, además de presentar diferencias epigenéticas y de expresión genómica en función del tejido donde residen. En cuanto a su función antimicrobiana, los macrófagos tienen una alta densidad de PRRs de superficie y al detectar PAMPs y DAMPs se activan, iniciando el proceso de fagocitosis y digestión de microorganismos, y secretan múltiples citoquinas y quimiocinas [44]. Presentan un sistema de lisosomas ampliamente desarrollado que contribuye a esta actividad fagocítica. También presentan antígenos a los linfocitos para que se inicie la respuesta inmune adaptativa. Del mismo modo que ocurre con otros elementos del sistema inmune, los macrófagos tienen un papel dual: como protectores de múltiples agentes e inductores de enfermedades crónicas. Por ejemplo, la microglía a nivel cerebral, protege las neuronas

de las posibles infecciones, no obstante, su activación crónica es uno de los principales implicados en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer [45].

Pero además de las variantes tisulares, existe una amplia heterogeneidad macrofágica dentro de los propios tejidos; lo que les permite realizar diferentes funciones en la inmunovigilancia y homeostasis tisular. De hecho, los macrófagos pueden diferenciarse en el subtipo M1 (proinflamatorios), al ponerse en contacto con microorganismos; o en subtipo M2 (antiinflamatorios) [39]. Éstos se generan cuando la diferenciación se produce en presencia de citoquinas como IL-4 e IL-13, y producen sustancias (como la arginasa) que promueve la reparación tisular y tienen un papel crucial en la resolución de la inflamación. Pero recientemente se ha demostrado que la clasificación M1-M2 es una diferenciación simplificada, y que el espectro funcional de estas células es mucho mayor. Por otro lado, aunque los macrófagos residentes son los elementos principales iniciadores de la respuesta inflamatoria, los monocitos CD14⁺ son reclutados a localizaciones donde se producen estos sucesos patológicos (como puede ser la inflamación o un tumor) y dan lugar a los macrófagos tisulares derivados de monocitos, y en este contexto, estos serán los macrófagos predominantes durante el proceso inflamatorio [37].

Por tanto, debido a su ubicuidad y su participación en múltiples procesos fisiológicos y también patológicos, los macrófagos son elementos implicados en multitud de enfermedades y en prácticamente todos los órganos [42]. En el microambiente tumoral, se ha descrito que los macrófagos

mayoritarios son M2, y que por esto, promueven el crecimiento de las células tumorales, la angiogénesis y la invasión tisular y metastatización, aunque también existe heterogeneidad en las subpoblaciones [39]. En cambio, pueden tener efecto reparador en el contexto de las lesiones medulares, lo que de nuevo apoya que los monocitos y macrófagos presentan importante plasticidad.

Las **células dendríticas** (DC) constituyen la población más relevante de CPA, y funcionan como nexo de unión entre el sistema inmune innato y el sistema inmune adquirido. Su denominación viene definida porque poseen prolongaciones citoplasmáticas digitiformes (dendritas) y son células con capacidad endocítica [35]. Las células dendríticas proceden de un progenitor mieloide común para este subtipo celular y los macrófagos; en la médula ósea éste evoluciona a la célula progenitora de células dendríticas que puede diferenciarse a su vez en dos grandes subtipos: células dendríticas plasmocitoides (pDC) y las células dendríticas mieloides o convencionales (mDC o cDC). En sangre periférica, las DC representan un 0.1-1% de las células mononucleares [46] y se distinguen típicamente por su alta expresión de CMH y CD45 y la ausencia de marcadores de linfocitos T (CD3), B (CD19 y CD20), y NK (CD56), es decir, son CMH-DR⁺ y linaje⁻.

Como parte del sistema inmune innato capturan tanto microorganismos como fragmentos celulares y otras moléculas para su procesado, aunque de un modo muy versátil, debido a su gran variedad de PRR de membrana que pueden unirse a múltiples PAMPs y DAMPs. Esto promueve su maduración, con

la cual progresivamente irán perdiendo capacidad fagocítica, pero aumentará la expresión de receptores de citoquinas, del CMH tipo II y de receptores coestimuladores (como CD80 y CD86), imprescindibles para la presentación antigénica y la secreción de citoquinas para la activación de los linfocitos [47], esto último, las convierte en componentes esenciales del sistema inmune adaptativo. La maduración de estas células permite su migración a los ganglios linfáticos donde se lleva a cabo la presentación antigénica a linfocitos T, lo que conlleva (en un complejo proceso) o bien la activación de la inmunidad específica para promover la eliminación del elemento del que procede el antígeno, o bien, inducen la tolerancia a dichos antígenos [48]. Esta anergia de los linfocitos T se produce cuando las células dendríticas presentan antígenos propios, en ausencia de moléculas coestimuladoras y permite la tolerancia de las estructuras propias y de otras no patogénicas [49].

Aunque esta es la función que, genéricamente, se atribuye a las células dendríticas, existen grandes diferencias en cuanto a sus subtipos celulares: las pDCs (que se distinguen por la expresión de CD123) poseen una competencia reducida en cuanto a la estimulación de las células T ya que su expresión de CMH tipo I y II, así como de moléculas coestimuladoras es mucho menor; no obstante, juegan un papel decisivo en las infecciones víricas debido a su enorme capacidad de producción de IFN I (y también tipo III así como de citoquinas) [50] mediado por el reconocimiento de ácidos nucleicos derivados de patógenos mediante TLR7 y TLR9 (que detectan RNA de cadena simple y DNA de cadena doble, respectivamente, a

través de células infectadas) [46]. El IFN-I es crucial para la supervivencia de cDCs y macrófagos, además activa las células NK y amplifica la respuesta de citoquinas. La morfología de estas DCs es por tanto también distinta, semejante a la de las células plasmáticas (más redondeada que las mDCs, propia de células secretoras). La activación que ocurre con la producción masiva de IFN-I conduce a la muerte por apoptosis de muchas de estas pDCs [48]. De todos modos, su función no se limita a la producción de citoquinas, y actualmente se conoce que existe cierta heterogeneidad celular; de modo que, algunas de las células se encargarán también de la presentación antigénica, o incluso en diferentes estados de la activación celular, en una misma célula [51]. Por último, la diferenciación de las pDCs se realiza en la médula ósea, mientras que las mDCs finalizan su maduración en los tejidos [48].

Las mDCs a su vez, se clasifican en 2 grupos mayoritarios: mDCs CD1c⁺ (mDCs 2) y mCD141⁺ o CLEC9A⁺ (este marcador, dentro de la familia de receptores con dominio de lectina tipo C, es común en la especie humana y en ratones, lo cual sugiere que sea una proteína conservada evolutivamente en distintas especies, y es capaz de detectar ligandos expuestos en las células necróticas) (mDCs 1) [46].

Las células CLEC9A⁺ (o CD141⁺) representan aproximadamente el 10% de mDCs y se caracterizan por expresar TLR3, altos niveles de CMH tipo 1 (con el que presentan antígenos extracelulares), y por producir IFN β , entre otros, con la consiguiente inducción de la respuesta inmunológica tipo I [52]. Son las principales presentadoras de

antígenos a los linfocitos T CD8⁺, y por lo tanto, regulan la respuesta inmune celular citotóxica contra patógenos intracelulares y células tumorales. Sobre los linfocitos T CD4⁺ principalmente inducen la estimulación de la diferenciación de linfocitos Th1 (fenotipo proinflamatorio), y en menor medida, pueden producir una diferenciación Th2 (fenotipo anti-inflamatorio y con papel en las infecciones de helmintos y reacciones alérgicas).

Las mDCs CD1c⁺ son la población mayoritaria de entre las mDCs en sangre (y también en tejidos linfoides y no linfoides). Su expresión de TLRs es muy variada (TLR2, 3, 4, 5, 7, 8), así como su producción de citoquinas (IL-6, IL-23, IL-8, IL-10, TNF α , IL-1 β), lo cual les confiere un papel dual, con posibilidad de desencadenar respuestas inmunes Th1, Th2 e incluso sensibilización Th17 (fenotipo proinflamatorio, que puede intervenir en procesos autoinmunes). Su mayor activación se produce con la estimulación de TLR4 y TLR8, y son las células más potentes en cuanto a la producción de IL-12 [48]. Se encargan de presentar antígenos solubles a los linfocitos T CD4⁺, por lo que regulan principalmente la respuesta inmune contra patógenos extracelulares, parásitos y alérgenos; por tanto, pueden controlar la respuesta inmunológica humoral, tipo I, tipo II y tipo III mediante la presentación antigénica y la polarización de la producción de citoquinas. Estas diferencias vendrán determinadas por el microambiente en el que maduren estas mDCs [53].

Se ha descrito un tercer subtipo de mDCs, que expresan CD16 y que se conocen como DCs inflamatorias, aunque recientemente se ha postulado que provengan de monocitos [52, 54]. Su clasificación dentro de las células dendríticas se debe a su ausencia de marcadores de linaje descritos previamente, aunque se caracterizan por ser CD141⁺, CD16⁺ y CD14⁺ (este último es un marcador presente en monocitos). Estas células aumentan significativamente en estados proinflamatorios y generan IL-1 β , IL-6, además de inducir la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ a células Th17 [53].

Existe también un subtipo especial, las DCs foliculares, que no derivan de progenitores mieloides y cuya función no es la presentación antigénica a los linfocitos T, sino mostrar antígenos proteicos para la selección de los linfocitos B [55]. Este proceso ocurre en ganglios linfáticos, bazo y tejidos mucosos linfoides. Las células de Langerhans situadas en la epidermis se han considerado clásicamente un subtipo especializado de DCs activadas [56], aunque recientemente, debido al conocimiento de que su progenitor es eritromieloide, se consideran un subtipo de macrófagos tisulares [40].

Los **linfocitos NK** son otro de los componentes principales del sistema inmune inespecífico, y se supone que, en sangre periférica, circulan alrededor de 2 billones de estos linfocitos, constituyendo del 5 al 18% de los linfocitos en sangre periférica en humanos [57]. Clásicamente se han descrito como células citotóxicas capaces de destruir células tumorales, así como células infectadas por virus (gracias a sus característicos gránulos, llenos de granzimas y perforinas), sin requerir una

estimulación antigénica previa; pero además, tienen gran potencial para generar citoquinas. Aunque son células linfoides, derivadas del progenitor hematopoyético CD34⁺, no expresan receptores específicos de antígenos. No obstante, sí tienen capacidad de modulación de su funcionalidad basada en la exposición antigénica previa, mediante un mecanismo muy distinto al que emplean las células T y B (en estos, consiste en el reordenamiento genético de los genes de los receptores de las células T y de las inmunoglobulinas, respectivamente). Globalmente, se identifican con el fenotipo CD3⁻CD56⁺, aunque se sugiere que uno de los receptores activadores más potentes de estas células (NKp46), podría definir mejor este subtipo celular [58]. A su vez, las células NK maduras se clasifican en linfocitos NK CD56^{bright} y CD56^{dim} en base a su funcionalidad, considerándose CD56^{dim} la población más madura y con mayor capacidad citotóxica; mientras que la población CD56^{bright} posee escasa capacidad citotóxica pero constituye una importante productora de citoquinas y quimiocinas que consiguen modular la respuesta inmune tanto innata como específica (en especial interferón (IFN)- γ) [59].

Los últimos años se han hecho profundos avances en el conocimiento del desarrollo de los linfocitos NK: aunque se suponía que estas células se generan en la médula ósea y maduran en ésta, así como en órganos linfoides secundarios (principalmente ganglios linfáticos y bazo), y posteriormente circulan por el torrente sanguíneo (mayoritariamente linfocitos NK CD56^{dim}) hasta los tejidos, donde sufren un segundo proceso de diferenciación; ahora se ha descubierto que células

precursoras hematopoyéticas CD34⁺ pueden encontrarse en algunos tejidos como el útero, y evolucionar desde el inicio a linfocitos NK [60]. Pero además, se ha descubierto que los linfocitos NK forman parte de un espectro más amplio de células, las denominadas células linfoides innatas (*innate lymphoid cells, ILC*), en concreto, del subtipo 1, y que se describirán más adelante.

En cuanto a su funcionalidad, ésta vendrá determinada por la integración de señales activadoras e inhibitoras que se producen simultáneamente en el encuentro entre el linfocito NK y células circundantes, y la prevalencia de unas sobre otras. Los receptores inhibidores característicos de las células NK en humanos se denominan receptores asesinos de células similares a inmunoglobulinas (*killer cell immunoglobulin-like receptor, KIR*), y tienen la capacidad de unirse a las moléculas del CMH tipo I; esta unión induce la fosforilación de la porción citoplasmática del receptor que es capaz de neutralizar las señales de activación [58]. Por otro lado, de entre los receptores activadores, destaca el receptor activador de NKD grupo 2 miembro D (NKG2D), que pertenece a la familia de receptores *lectina-like* (y que también está presente en los linfocitos T CD8⁺ y algunos linfocitos T $\gamma\delta$). Este receptor, se une a moléculas expresadas en la superficie de las células anómalas que se generan como respuesta a daños en el ácido desoxirribonucleico (ADN) intracelular; y se genera una cascada que activa la vía de las proteína-quinasas activadas por mitógeno (MAPK) e induce la movilización del citoesqueleto celular y finalmente, la liberación de los gránulos citoplasmáticos de los

neutrófilos [61]. Existe también un grupo de proteínas de membrana conocido como receptores de citotoxicidad natural (NCR) cuya fracción extracelular es similar a la de las inmunoglobulinas y producen también una señal activadora.

En condiciones fisiológicas, la señal inhibidora es más potente que la activadora, lo cual, no conduce a la activación de las células NK. No obstante, las células que tienen expresión reducida de CMH-I (como ocurre en las células tumorales o en las infectadas por virus), carecen de esta señal inhibitoria, por lo que inducen la secreción de perforinas y granzimas en la sinapsis entre ambas células; estas moléculas alteran la membrana de las células diana e inducen su muerte celular por apoptosis. Esto es promovido además por la unión de NCRs y NKG2D a las moléculas de “estrés celular” y la señal de activación que esto conlleva.

Otro mecanismo por el que pueden producir la muerte celular por apoptosis es mediante la unión de receptores de membrana del linfocito NK (ligando de Fas o TRAIL), con sus receptores correspondientes (Fas y TRAIL-R). Por último, otra molécula de superficie en los linfocitos NK, CD16, reconoce Ig, cuya unión también inicia la liberación de gránulos citotóxicos (citotoxicidad mediada por anticuerpos) [61].

Además de todo esto, recientemente se ha demostrado que se pueden generar linfocitos NK que actuarían como células de memoria, y que persisten en el individuo durante tiempo prolongado, en 3 contextos: linfocitos NK residentes en el hígado, linfocitos NK específicos tras infección por

citomegalovirus (CMV) e inducidos por diversas citoquinas [62]. Este fenómeno, denominado “entrenamiento” se genera gracias a mecanismos epigenéticos (como las modificaciones en histonas o metilación del ADN) o la reprogramación transcripcional [63]. Esto, junto con la demostrada capacidad de inmunomodulación (más allá de la función citotóxica y como productores de citoquinas) y la heterogeneidad descrita de estas células en diferentes tejidos, sugiere que este subgrupo celular posee una elevada complejidad, cuyo estudio está en auge por sus posibles aplicaciones terapéuticas en cáncer y en enfermedades inflamatorias.

Como se ha mencionado previamente, los linfocitos NK son un subtipo de **células linfoides innatas** (ILC) que proceden del progenitor hematopoyético linfoide CD34⁺. Además de carecer del mecanismo de recombinación somática, tampoco tienen la capacidad de expandirse de forma clonal cuando son estimulados, como ocurre con los linfocitos T y B. Se localizan principalmente en la piel y mucosas y también en el tejido adiposo y se distinguen 3 subtipos en función del perfil de citoquinas que producen, los factores de transcripción necesarios para su desarrollo y su funcionalidad (ILC 1-3) [64, 65]. Los linfocitos NK pertenecen al grupo de ILC-1, y se definen por su capacidad para producir citoquinas de tipo 1 (principalmente IFN γ), y la dependencia del factor de transcripción T-bet y la IL-15 para su maduración [66]; estos ILC-1 no-NK pueden diferenciarse de las células NK porque no expresan la proteína Eomes [67]. Por otro lado, los ILC-2, también conocidos como células reguladoras innatas (análogas

a los linfocitos T CD4⁺ reguladoras) secretan multitud de citoquinas como IL-5, IL-9, IL13; y pueden producir también IL-6, IL-10 y el factor estimulador de colonias de granulocitos (GM-CSF), y el factor transcripcional del que dependen es ROR α [64]. Poseen un papel importante en las fases iniciales de la infección por helmintos y también en las reacciones alérgicas [68]. Por último, las ILC-3 dependen del factor de transcripción ROR- γ t y GATA3 así como la presencia de IL-7. Tienen un papel crucial en la ontogénesis linfoide, en la homeostasis y defensa tisular (en especial a nivel epitelial, limitando también la acción de los linfocitos T contra los microorganismos comensales de la microbiota intestinal), y también participan en la resolución del proceso inflamatorio agudo y en la reparación de los tejidos [64, 69]. Conjuntamente, presentan una gran capacidad plástica, y se ha sugerido que ILC-2 y 3 pueden reconvertirse en linfocitos NK bajo algunas circunstancias [67].

También otras células circulantes contribuyen a la inmunidad inespecífica: en concreto, las **plaquetas**, además de jugar un papel crucial en la coagulación, colaboran en la defensa del individuo como centinelas circulantes, ya que expresan PRRs (en concreto expresan TLR1, 2, 4 y 9, entre otros) cuya unión a PAMPs y DAMPs induce la producción de citoquinas, el reclutamiento de neutrófilos, su hiperactivación y la NETosis y, por tanto, median eventos proinflamatorios al interactuar con leucocitos y células endoteliales [70, 71]. Incluso pueden actuar sobre la respuesta inmune adaptativa mediante la expresión de CD40 y su ligando (y así promover la secreción de citoquinas como IL-6) y actuar como CPA mediante el CMH-I [72]. También

intervienen en la reparación tisular y la resolución de la inflamación, pero como se ha descrito previamente pueden mediar procesos inflamatorios crónicos y favorecer enfermedades como ocurre en la formación de placas de ateroma [73]. Los **eosinófilos** suponen el 1-5% de los leucocitos en sangre y juegan un papel singular en las infecciones por parásitos e intervienen en el desarrollo del asma [74, 75], pero poseen también la capacidad de secretar citoquinas proinflamatorias tras ser activados por PAMPs, modulan la respuesta linfocitaria Th2 y expresan en su superficie CMH-II, aunque la relevancia clínica como CPA no es del todo conocida [76]. Por último, los **basófilos**, que tienen un origen mieloide, expresan receptores de gran afinidad para IgE, y por tanto, participan en los procesos de alergia (junto con mastocitos y eosinófilos) e infestaciones por helmintos. Participan en la inmunidad innata como células reguladoras (más que efectoras) mediante la secreción de citoquinas y quimiocinas que aumentan la permeabilidad vascular y permiten a otras células innatas y a los linfocitos T acudir a localizaciones donde existe un proceso inflamatorio; además, contribuyen a la respuesta inmunológica tipo Th2 mediante la producción de IL-4 [77].

Finalmente, hay que destacar células localizadas en los tejidos que también colaboran con la inmunidad inespecífica. En primer lugar, los **mastocitos**, que participan sobre todo en procesos alérgicos y la protección en la infección por protozoos; pero también tienen capacidad antimicrobiana mediante enzimas proteolíticas y un papel inmunomodulador ya que se comportan, en algunos contextos como CPA [76, 78]. Las

células epiteliales, ya se han descrito como responsables de conformar barreras físicas y bioquímicas, pero además son, en muchas ocasiones, las primeras células en ponerse en contacto con patógenos, y expresan también PRRs en su superficie [79, 80]. Mediante la detección de PAMPs producen múltiples citoquinas y quimiocinas que atraen a células capaces de destruir los microorganismos, secretan sustancias que opsonizan a los microorganismos, en la mucosa intestinal transportan la IgA, además de regular la respuesta adaptativa, principalmente con la interrelación con los linfocitos T CD4⁺ [81]. Los **adipocitos**, a su vez, coordinan la respuesta inflamatoria en el tejido graso de los leucocitos, de hecho, en pacientes obesos, con adipocitos aumentados de tamaño, las células inmunes acompañantes secretan sustancias proinflamatorias a nivel local (como TNF-gamma, IFN-gamma, IL-1 e IL-6), y los macrófagos predominantes son del tipo M1, y esto no ocurre en pacientes no obesos (predominan los macrófagos M2, antiinflamatorios) [82–84]. La secreción de leptina por los adipocitos, no sólo actúa como regulador del equilibrio energético y calórico, sino que puede actuar también como señalizador para células del sistema inmune y por tanto, actualmente se considera una citoquina [85].

1.1.1.3. La microbiota

Recientemente se ha considerado que los microorganismos (bacterias, hongos, virus y otros parásitos) [7] que conviven en las superficies del organismo (como la piel, el sistema digestivo y otras mucosas) tienen un gran impacto en los mecanismos de

defensa del individuo. Este conjunto de microorganismos globalmente se denomina microbiota y tiene una compleja interrelación con el sistema inmunológico de los mamíferos [86]. En primer lugar, la variedad biológica de estos microorganismos influye en el desarrollo del sistema inmunológico de los seres humanos, así como en su efectividad. Así mismo, evita que exista un crecimiento excesivo de patógenos y por último, modula el equilibrio entre los procesos inflamatorios y la homeostasis inmunológica e incluso se ha relacionado con el proceso de entrenamiento del sistema inmune innato [87]. Así mismo, para el mantenimiento de la composición de la microbiota, el sistema inmune del individuo debe funcionar adecuadamente, por lo que se genera una relación simbiótica entre huésped y microorganismos.

La composición de la microbiota presenta una gran variabilidad interindividual, y se modifica con el transcurso de los años, el uso de antibióticos o los cambios dietéticos, aunque la mayor variabilidad interindividual se adquiere en los primeros 3 años de vida [88]. Actualmente se sabe que la microbiota está presente en distintas superficies del organismo, pero la relación más estudiada entre huésped y microbiota es la que existe a nivel intestinal. Este interés viene definido por la abundante presencia de microorganismos en la superficie intestinal, sus múltiples cambios debidos a la ingesta de microbios no patógenos con el agua y la alimentación, a pesar de los cuales se mantiene una situación de homeostasis; y también por la capacidad de detección y respuesta inmunológica contra

patógenos, o de microorganismos habitualmente comensales si éstos penetran a nivel sistémico.

Se supone que la distinción entre bacterias propias de la microbiota del huésped, y bacterias patógenas se consigue gracias a una co-evolución tanto de las células inmunes como de la microbiota debido a su contacto persistente, y a que existe una mayor complejidad en cuanto al reconocimiento de PRR-PAMPs de la que originariamente se creía, de modo que, probablemente un solo agregado receptor-ligando no es el responsable de desencadenar una respuesta celular, sino que probablemente, la combinación de diferentes PRR-PAMPs crea una firma particular que caracteriza a la bacteria detectada y promueve la tolerancia o la reacción inflamatoria en la célula del sistema inmunológico, y esto además se asocia con un proceso de entrenamiento inmunológico que prolonga esta tolerancia [87]. Pero como ya se ha descrito, se ha observado que esta relación es dinámica, y que múltiples factores externos pueden alterar este equilibrio (dieta, exposición a contaminantes, nacimiento por cesárea o por vía vaginal, exposición antigénica...) y dar lugar a cambios que tengan un impacto a corto o a largo plazo en la microbiota y que pueden afectar al sistema inmunológico.

La disbiosis supone un cambio en la composición y diversidad de la microbiota, y origina una transformación de una situación de salud, a un marco que puede conducir a la enfermedad o a una situación premórbida (esto ocurre, por ejemplo, con el uso de antibióticos, que puede permitir la proliferación de *Clostridium difficile* a nivel intestinal y producir

diarrea, o favorecer la candidiasis vaginal); y también a que se produzca una respuesta inmunológica disfuncional. Se ha demostrado que este hecho puede llegar a influir en patologías a nivel local como en el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal o la psoriasis, pero también enfermedades sistémicas como la artritis reumatoide o patologías neurodegenerativas, debido, entre otros factores, a la producción de metabolitos por estos microorganismos [89]. Esto conlleva que exista un creciente interés en la caracterización de la disbiosis, y en conocer las alteraciones que promueven el inicio de estados patológicos y distinguirlas de aquellas que son secundarias a una patología subyacente previa, pero que pueden favorecer su progresión.

Por último, aunque la relación entre la microbiota y el huésped se ha estudiado principalmente a nivel intestinal, en el árbol bronquial existe también un complejo conjunto de flora bacteriana con la que mantiene una relación simbiótica y que juega un papel crucial en la tolerancia inmunológica a nivel pulmonar, de modo que se evitan reacciones inflamatorias exageradas ante estímulos que no son dañinos [90]. Además, interviene a la hora de desencadenar una respuesta inflamatoria eficaz contra patógenos que penetren en la vía aérea. Incluso se ha observado que la microbiota pulmonar se modifica sustancialmente en circunstancias patológicas como el cáncer. De hecho, en el pulmón sano, aunque existe un recambio natural de bacterias simbióticas, su tasa de replicación es muy baja, mientras que en condiciones patológicas se crea la situación adecuada para la proliferación de algunos subtipos bacterianos,

y por ejemplo, se ha demostrado que en pacientes con cáncer de pulmón, aunque la biodiversidad de la microbiota es menor que en individuos sanos, existe una mayor carga bacteriana y algunos grupos taxonómicos son mucho más abundantes que en individuos sin cáncer [91]. Esto, podría ser el origen de una “reprogramación inmunológica” a nivel pulmonar que se relacione con el desarrollo, progresión y pronóstico del cáncer de pulmón.

Por lo tanto, el conocimiento y las posibilidades de modulación de la microbiota podrían constituir una de las armas terapéuticas para múltiples patologías [92].

1.1.1.4. Capacidad de entrenamiento del sistema inmune innato

Para concluir este apartado, cabe resaltar que aunque clásicamente la memoria inmunológica se ha descrito como una característica específica del sistema inmune adaptativo, actualmente se conoce que las células del sistema inmune innato sí tienen capacidad de modulación de su respuesta inmunológica que viene definida por exposición a antígenos previos [93].

No obstante, esto no se produce mediante reordenamientos genómicos y por tanto los cambios que se producen en estas células no son permanentes. Lo que sucede es que tras la exposición antigénica (con la unión de PAMPs a PRRs) se producen cambios epigenéticos que promueven respuestas inmunológicas más potentes tras el contacto con otros antígenos

[63], por ejemplo, mediante la modificación de histonas de genes que codifican citoquinas proinflamatorias como la IL-6.

1.1.2. El sistema inmune adaptativo

El sistema inmune adaptativo, también denominado adquirido o específico implica un conjunto de elementos humorales y celulares que, a través de las CPA inducen una respuesta específica contra cada patógeno, lo que conlleva que su repertorio será diferente para cada individuo en función de su exposición antigénica a lo largo de la vida. Globalmente, a sus elementos se les atribuye la capacidad de generación de memoria inmunológica, así como de regulación de la homeostasis inmunológica [94].

Los linfocitos son las células protagonistas de este tipo de respuesta inmune. Éstas, se generan, se desarrollan y se activan en los órganos linfoides primarios (médula ósea y timo) y secundarios (ganglios linfáticos, bazo, amígdalas y agregados linfoides en el tracto gastrointestinal y respiratorio), en contacto constante con otras células del sistema inmunológico. También se han descrito recientemente los órganos linfoides terciarios, que constituyen estructuras linfoides que se desarrollan en tejidos no linfoides donde existe inflamación crónica (como ocurre por ejemplo en los tumores) [95].

La célula precursora de los linfocitos es la célula madre hematopoyética, como del resto de glóbulos blancos. La división asimétrica de esta célula, da lugar a progenitores multipotentes

que comprometen su diferenciación en función de distintos factores de transcripción hacia el linaje B o T de linfocitos. Una de estas células derivadas, denominada progenitor tímico migra precozmente al timo, donde las células estromales expresan ligandos que activan la vía *Notch* e iniciará la diferenciación hacia células T.

En cuanto al desarrollo de los linfocitos, cabe destacar su capacidad de reordenamiento genómico, que genera nuevos genes que transcriben para receptores de antígenos con una amplia variabilidad, lo cual ofrece una capacidad inmensa para reconocer componentes de todos los patógenos potenciales [96]. Esto ocurre tanto en células T como B, y cuando una de estas células potencialmente preparada para ser activada por la presentación del antígeno específico que reconoce, se produce una replicación clonal de esta célula, incluyendo células de memoria que perdurarán en el individuo, preparadas para actuar de forma rápida contra el mismo antígeno en un segundo encuentro.

1.1.2.1. Linfocitos T

Las células T son las principales responsables de la inmunidad adaptativa celular, pero participan también como coadyuvantes en la inmunidad humoral, intervienen en las reacciones alérgicas así como en procesos de autoinmunidad. El desarrollo y maduración de la gran mayoría de los linfocitos T se produce en el timo (aunque un pequeño porcentaje maduran en la lámina propia intestinal). Este proceso está determinado

básicamente por la vía Notch y la presencia de IL-7 (de hecho, la ausencia de esta señalización impide la diferenciación de los progenitores hacia células T; y de modo opuesto, la activación de esta vía en la médula ósea, impide la diferenciación de las células linfoides precursoras a linfocitos B, produciéndose una maduración ectópica de linfocitos T) [97, 98]. Además, las células tímicas circundantes secretan otras hormonas y citoquinas esenciales para esta diferenciación.

A su vez, el marcador que distingue a estas células en sangre periférica es CD3, el cual va a permitir su detección mediante citometría de flujo, y que forma un complejo con otra de las moléculas principales en la membrana de las células T: el *T cell receptor* (TCR) [99]. Este complejo TCR-CD3 constituye el elemento principal en la unión con el antígeno procesado y presentado por las CPA, así como para transducir la señalización al interior celular.

Precozmente durante su maduración en el timo, se diferencian dos subtipos principales de linfocitos T ($\alpha\beta$ y $\gamma\delta$) en función del tipo de TCR, que es un receptor heterodimérico codificado por secuencias genéticas con capacidad de reordenamiento que está regulada por promotores, potenciadores y otras secuencias genómicas así como por la disposición de la cromatina, a través de mecanismos de alta complejidad (como ocurre con las inmunoglobulinas) [100]. De este modo, las proteínas TCR contienen una región variable (V), de diversidad (D), de unión (J de *joining*) y constante (C). En sangre periférica, alrededor del 90-99% de los linfocitos T

expresan el TCR $\alpha\beta$ (TCR2), mientras que el 1-10% restante expresan TCR $\gamma\delta$ (TCR1).

Linfocitos T $\gamma\delta$:

Aunque son también linfocitos generados a partir del mismo precursor en el timo, el subgrupo de células T $\gamma\delta$ tienen una funcionalidad que se asemeja al sistema inmune innato: presentan de forma constitutiva un estado de pre-activación, y responden a señales generadas por PAMPs y DAMPs, por lo que pueden actuar tanto contra microorganismos patógenos como contra células sometidas a estrés (infectadas por virus, tumorales...). Pueden activarse incluso sin implicación del TCR, lo cual permite un papel efector mucho más rápido; y reconocen antígenos independientemente del CMH, por lo que no requieren la actuación de las CPA. Además, aunque se generan en el timo, su desarrollo se produce principalmente en tejidos periféricos, son habitualmente CD4⁻ CD8⁻ y no sufren el proceso de selección madurativa por el que pasan los linfocitos T $\alpha\beta$ y son los linfocitos predominantes durante las primeras semanas del desarrollo fetal [101]. No obstante, comparten características definitorias de las células del sistema inmune específico, como la expansión clonal y la generación de células de memoria tras la exposición antigénica.

Por otro lado, su TCR no presenta una amplia capacidad de reordenamiento, por eso se denominan también linfocitos con reordenamientos limitados. Puesto que la mayoría no expresan CD4 ni CD8, se clasifican en función de la región V δ .

Básicamente, existen 4 genes V δ (1, 2, 3 y 5), junto con 7 segmentos funcionales V γ . La asociación de estas dos cadenas para formar el heterodímero no se produce con todas las combinaciones posibles, sino que existen unas pocas combinaciones fijas (ej. V γ 9⁺V δ 2⁺) [102]. En cuanto a su distribución, son más abundantes en los tejidos que en sangre periférica, pero su localización difiere en los diferentes subtipos: los linfocitos V δ 1⁺ predominan en el epitelio, V δ 2⁺ son los mayoritarios en sangre periférica, y V δ 3⁺ se localizan principalmente en hígado e intestino y son efectores fundamentales en las infecciones víricas [103]. V δ 5⁺ también se encuentran predominantemente en sangre.

Como se ha descrito previamente, los linfocitos V δ 2⁺ expresan también V γ 9, y representan >90% de los linfocitos $\gamma\delta$ circulantes en el ser humano. Estas células pueden ser reclutadas a tejidos periféricos donde exista un proceso infeccioso, ya que reconocen a un amplio espectro de microorganismos así como de células infectadas. Además de distinguirse funcionalmente en cuanto al subtipo de TCR $\gamma\delta$, se diferencian en función del microambiente en el que se encuentren: pueden producir citoquinas como IL-4, 5 y 13 en el contexto de infecciones por parásitos; IL-17 en las infecciones por bacterias y hongos, así como en procesos de autoinmunidad; e IFN- γ y TNF- α como respuesta a células infectadas por patógenos intracelulares; a su vez existen subtipos de linfocitos $\gamma\delta$ reguladores que expresan FOXP3 (*forkhead box P3*) [104]. De hecho, la diferenciación y funcionalidad final de estas células dependerá del conjunto de

citoquinas y quimiocinas que interactúan en la localización donde se desarrollen. A su vez, estas células pueden clasificarse en función de su estadio madurativo en *naïve*, *central memory*, *effector memory* y *terminally differentiated*.

En cuanto a su funcionalidad, como se ha descrito, su principal característica diferencial frente a los linfocitos $\alpha\beta$ es que no dependen del CMH para el reconocimiento antigénico y su activación. Principalmente detectan moléculas fosforiladas denominadas fosfoantígenos, que producen bacterias, pero también células tumorales; y son fundamentalmente detectados por los linfocitos $V\gamma 9^+V\delta 2^+$ mediante unas moléculas transmembrana denominadas butirofilinas. Además, reconocen moléculas “de estrés” derivadas del CMH de células malignas o infectadas. De todos modos, esta activación puede ser modulada por moléculas coadyuvantes como CD27 y NKG2D, o TLRs [105]. Estas células activadas, además de producir citoquinas, pueden ejercer actividad citotóxica. Debido a su localización predominante en los tejidos, tienen un papel fundamental en la inmunovigilancia mediante la monitorización constante de la integridad tisular, y en caso de una disrupción de la misma, tienen la capacidad de preparar el microambiente para la acción de los linfocitos T $\alpha\beta$ y los linfocitos B [106]. De hecho, la interacción con los linfocitos B a través de moléculas coestimuladoras (como CD40/CD40-L) o CD86/CD28 podría promover la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas, y a la inversa, los linfocitos B también tienen la capacidad de modular la activación de estas células [107]. Por todo esto los linfocitos T con TCR $\gamma\delta$ son considerados como

facilitadores de la generación de una respuesta inmunológica efectiva en el contexto de un microambiente determinado, además de ser propiamente células efectoras citotóxicas, opsonizadoras de bacterias, actuar como CPA... [108].

Linfocitos T $\alpha\beta$:

Como se ha descrito previamente, en estadios tempranos de la maduración de los linfocitos T, éstos se diferencian en células $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$; cuyo proceso va a determinar su funcionalidad, localización anatómica y capacidad de reconocimiento de antígenos. Aunque este desarrollo se ha estudiado sobre todo en ratones, se supone que la maduración y diferenciación de células T en humanos se produce de forma muy similar.

De modo que, los linfocitos T que consiguen reordenamientos adecuados expresan cadenas TCR- β que se unen a cadenas α inmaduras, y este complejo se asocia con CD3. Es en este punto es cuando se desencadena la expresión de CD4 y CD8, el reordenamiento de las cadenas α y la expansión celular [109].

CD4 es una glicoproteína que permite la interacción de los linfocitos con células que expresan el CMH tipo II [110]. Por otro lado, CD8 se constituye por dos polipéptidos y se une a moléculas del CMH I. A nivel citoplásmico ambos receptores poseen un dominio tirosina-quinasa que activa cascadas intracelulares que promueven la activación celular. De todos modos, esto requiere la unión de otras moléculas

coestimuladoras como CD28, sin las cuales no puede producirse la activación de las células T [111].

Durante el proceso madurativo, los linfocitos T presentan expresión doble de CD4 y CD8, y aquellas células que no son capaces de reconocer las moléculas del CMH (mediante el complejo TCR-CD3-CD4-CD8) mueren por apoptosis. A partir de este evento, continúa la diferenciación de estas células hasta la fase final en el timo, en la cual, los linfocitos T acabarán expresando solamente CD4 o CD8. Además, estos linfocitos deben ser capaces de reconocer agentes extraños para iniciar la respuesta inmune, y permanecer inactivos ante los elementos propios del individuo [112].

Esto acontece mediante un proceso de selección positiva (a través del reconocimiento de moléculas propias presentadas mediante el CMH, con una interacción débil que conduce a la supervivencia de estas células) [113] y un proceso de selección negativa (mediante el cual el reconocimiento de antígenos propios a través del CMH con alta afinidad induce la muerte de estos linfocitos para evitar los procesos de autoinmunidad) [112, 114, 115]. Se definen estos procesos como restringidos por el CMH. Tras esto, los linfocitos son liberados al torrente sanguíneo, y circulan constantemente hacia los tejidos linfáticos hasta que se ponen en contacto con antígenos a través del CMH de las CPA.

Prácticamente todos los linfocitos maduros que salen del timo expresan TCR, CD2, CD3, CD5 y CD28. Además, expresan de forma diferencial CD4 o CD8, lo que permite distinguir los dos

grandes grupos de linfocitos T, con características y funcionalidad distintas. De hecho, la mayoría de linfocitos reguladores expresan CD4 y la mayoría de linfocitos citotóxicos expresan CD8, aunque esto no se cumple en todos los casos, y existen también linfocitos CD4⁺CD8⁺ [116].

Cuando los linfocitos salen al torrente sanguíneo como células inmaduras (denominadas *naïve*) hacia órganos linfoides secundarios, pueden ponerse en contacto con células dendríticas que precisamente migran a esos órganos para presentar antígenos.

Para que los linfocitos T se activen, debe producirse la unión entre el complejo TCR-CD3 (con CD4 o CD8) y el CMH (1^a señal), pero además, debe asociarse la estimulación de moléculas coestimuladoras (2^a señal) [117]. De entre ellas, destaca CD28 (aunque no es la única), que se une a B7-1 /-2 (también llamada CD80/86) presente en la CPA, y se genera una importante señal activadora que es crucial para la proliferación y maduración celular. Si la unión entre TCR-CD3 y CMH se produce sin esta 2^a señal, se induce la anergia celular en el linfocito [118]. De todos modos, la sinapsis inmunológica es compleja, incluye multitud de moléculas de membrana, y además, el fenotipo efector final de los linfocitos dependerá también del conjunto de citoquinas y otras moléculas circundantes del microambiente en el que se produzca esta interacción [119] (3^a señal).

Los **linfocitos T CD4⁺ naïve** circulan por el torrente sanguíneo y los órganos linfoides hasta que se ponen en

contacto con una CPA con CMH II (así como con otras moléculas coestimuladoras) e inician su proceso madurativo, que dependerá del perfil de citocinas circundantes [120], de modo que: cuando predomina IFN γ e IL-2 las células se diferencian en T *helper* de tipo 1 (Th1); mientras que si esta interacción se produce en un medio rico en IL-4, la diferenciación es hacia Th2 cuyo papel es crucial en las infecciones por parásitos.

Otros subtipos de linfocitos CD4⁺ efectores son los Th9, productores de IL-9 y 10 (que tienen un papel antitumoral, en procesos alérgicos y autoinmunes); Th17, que induce la producción de citoquinas proinflamatorias que atraen a neutrófilos [121]; y Th22, inducidas por IL-6 y TNF α , productores principales de IL-22 y con un papel en la inmunidad de las mucosas.

Por último, los linfocitos *helper* foliculares (Tfh) están presentes en órganos linfoides secundarios e intervienen en la estimulación de los linfocitos B para la producción de anticuerpos. Es relevante mencionar que en la mayoría de casos, estas células no pueden diferenciarse por sus receptores de membrana, sino por el patrón de citoquinas que sintetizan.

Y, de nuevo, los dos componentes principales del sistema inmunológico están íntimamente relacionados, de modo que el sistema inmune innato es capaz de controlar el tipo de respuesta inmunológica que se genera, ya que las CPA, linfocitos NK y otras células y moléculas acompañantes, inducen la

diferenciación de los linfocitos T *naïve* o inmaduros (Th0) hacia células efectoras Th1 o Th2 entre otras.

Por último, los linfocitos T CD4⁺ reguladores se desarrollan por la expresión del factor de transcripción FOXP3 y expresan receptores como CTLA-4 (antígeno 4 del linfocito T citotóxico o *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*), CD25, CD127, CD134 (OX40) o CD27 [122, 123]. Su función radica en mantener la tolerancia y supresión de la respuesta inmunológica, representando entre 1-2 % de los linfocitos CD4⁺. Otros tipos menos frecuentes con actividad reguladora son los iTreg (reguladores inducidos) y los linfocitos Th3.

En el caso de los **linfocitos CD8⁺ naïve**, su activación y desarrollo se produce tras la interacción con CPA mediante el CMH-I, previamente activados mediante la unión con linfocitos CD4⁺. Aunque los linfocitos CD8⁺ pueden tener actividad citotóxica no mediada por células CD4⁺, ésta no irá acompañada de una expansión clonal [124].

Los dos principales mecanismos de citotoxicidad son la secreción de gránulos con moléculas líticas y la expresión del ligando Fas (o CD95L), que se une en la célula diana a la molécula Fas e induce su apoptosis (por tanto, las células que no expresen Fas, no podrán ser eliminadas por este mecanismo) [125]. Cuando las células inmaduras son activadas algunas se convierten en células efectoras, con una vida media más corta; mientras que otras, se transforman en células de memoria, con capacidad para una rápida respuesta ante una 2^a estimulación antígeno. Las células T a lo largo de su diferenciación,

principalmente CD8⁺ se han dividido en 4 poblaciones principales con los siguientes marcadores de superficie: CD28, CD27, CCR7 y CD45RA [126].

- ▶ Linfocitos inmaduros o *naïve* (N): CCR7⁺ CD27⁺ CD28⁺ CD45RA⁺.
- ▶ Linfocitos centrales de memoria (CM): CCR7⁺ CD27⁺ CD28⁺ CD45RA⁻.
- ▶ Linfocitos efectores de memoria (EM): CCR7⁻ CD27[±] CD28[±] CD45RA⁻.
- ▶ Linfocitos efectores de memoria con diferenciación terminal y reexpresión de CD45RA (TEMRA): CCR7⁻ CD27⁻ CD28⁻ CD45RA⁺.

Además las células más diferenciadas expresan también con frecuencia CD57, KLRG1 y PD-1 (o CD279) [127] que se asocian a una respuesta pobre a los estímulos. De hecho, PD-1 (*programmed cell death 1*) compite por la interacción con el homólogo de B7, y esta unión con PD-1 inhibe la secreción de citoquinas así como actividades efectoras de los linfocitos T [128]. Además, moléculas como PD-1 o CTLA-4 (que compite con CD28 para unirse a B7), entre otras, contribuyen a la finalización de la activación de los linfocitos T, y conforman un mecanismo para evitar la respuesta inmunológica incontrolada (junto con muchos otros) (figura 1). También algunos de los cambios descritos ocurren en los linfocitos CD4⁺. Por último, debe tenerse en cuenta que las células inmaduras son las más abundantes al nacimiento, y su distribución va modificándose con la edad. Este hecho se desarrollará más adelante.

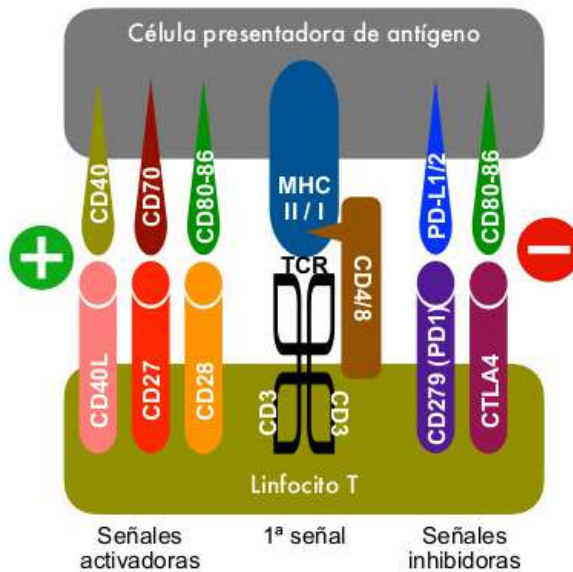


Figura 1. Principales moléculas en la sinapsis inmunológica entre CPA y linfocitos T.

1.1.2.2. Linfocitos B

Los linfocitos B se generan y desarrollan en la médula ósea y se encargan del control de la respuesta inmune humoral adaptativa. Su marcador de membrana principal es CD19 (que es un correceptor activador que transmite señales a nivel intracelular) [129]. Cada una de estas células, genera un receptor de superficie B único (BCR, también denominado inmunoglobulina, Ig), mediante el reordenamiento de las cadenas variables (V) y de diversidad (D); de un modo análogo al descrito previamente para las células T.

La estructura de las Ig (o BCR) la forman dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, y los dominios V de ambos serán los que reconozcan estructuras antigénicas [130]. Este reordenamiento de estructuras de las cadenas ligeras (denominadas kappa o lambda) permite la expresión en la membrana celular de la molécula IgM (o IgD).

Pero además, a diferencia del TCR, el BCR no necesita la presentación por parte del CMH para la activación celular. No obstante, sí existe una estrecha colaboración con los linfocitos T: las células T CD4⁺ activadas del subtipo Tfh interactúan con los linfocitos B que han reconocido el mismo antígeno fundamentalmente en órganos linfoides secundarios (sobre todo en ganglios linfáticos).

Esta interacción conlleva la endocitosis del BCR y el procesamiento vía CMH II del antígeno para presentarlo en la membrana y que lo vuelvan a detectar los linfocitos T [131]. Estas señales conducen a complejos cambios en la expresión de genes que amplifican señales activadoras, promueven la división celular y, a un cambio de isotipo o cambio de clase en el linfocito B, que, en presencia de IFN γ en lugar de IgM, producirá IgG; en presencia de IL-4, sintetizará IgE; y en presencia de TGF β entre otros, producirá IgA [132, 133]. En este momento se producen también mutaciones en los exones que codifican para las regiones V hipervariables, por lo que se producirán anticuerpos nuevos con afinidad aumentada.

Por último se producirá una selección de los linfocitos B que tengan receptores con mayor afinidad, lo que permite una

secreción de anticuerpos masiva; y estas células continuarán generando el mismo subtipo de anticuerpos durante el resto de su vida. Por otro lado, si las señales activadoras no se producen, la célula B responderá con anergia a ese antígeno.

Estos anticuerpos, ya en su forma soluble, consiguen la neutralización de toxinas, opsonización, favorecen la fagocitosis y la secreción de citoquinas proinflamatorias y activan el sistema del complemento [134]. Finalmente, algunas de estas células (denominadas plasmablastos), de vida media larga, se dirigirán a la médula ósea o permanecerán en los centros germinales para continuar produciendo anticuerpos. Cuando estas células dejan de replicarse y adquieren su estado de maduración terminal, se denominan células plasmáticas, cuya función es continuar con la producción de anticuerpos y permitir una respuesta rápida ante un segundo encuentro con el mismo antígeno [130].

El BCR, por tanto, puede reconocer de forma potencial, cualquier antígeno al que quede expuesto. De hecho, la activación de las células B puede producirse también de forma independiente a los linfocitos T, que pueden también generar linfocitos B de memoria y células plasmáticas, aunque con menor capacidad de producción de anticuerpos que en el caso de la vía dependiente de linfocitos T [135].

Finalmente, también como ocurre en el caso de los linfocitos T, existen mecanismos reguladores para frenar esta respuesta inmunitaria [136]. Pero en cuanto a su desarrollo y diferenciación, es mucho menos conocido que el que ocurre en

las células T, en parte por su elevada complejidad, ya que puede “reprogramarse” en función del microambiente, además de que este proceso es diferente en los primeros años de vida frente al que se produce en la edad adulta [137].

1.2. El envejecimiento fisiológico

El envejecimiento de los seres vivos es un evento progresivo, natural e irreversible (al menos hasta el momento) que ocurre con el avance de la edad cronológica, y conlleva el deterioro de las funciones orgánicas; aunque es tan complejo y heterogéneo, que es difícil de definir. Se estima que en el año 2050 aproximadamente 2 billones de personas serán mayores de 65 años [138], constituyendo un tercio de la población en Europa, por lo que el análisis de ese conjunto de la población constituye una prioridad a nivel socio-sanitario. Los fenómenos que conducen a la pérdida gradual de funcionalidades durante el envejecimiento no se conocen en su totalidad. Aunque este proceso implica un mayor riesgo de muchas enfermedades (incluyendo las neurodegenerativas, cardiovasculares, cáncer...), así como un mayor riesgo de muerte, esto no significa que el envejecimiento en sí mismo constituya un estado mórbido.

Es relevante destacar que los geriatras y gerontólogos, consideran que el envejecimiento se produce a nivel biológico, pero también a nivel psicológico y social, por lo que múltiples aspectos deben ser considerados para su evaluación [139].

A nivel biológico se caracteriza por una progresiva disminución de la capacidad de los tejidos para afrontar los elementos estresores (hecho conocido como homeostenosis), ya que constantemente se emplean las reservas para compensar los cambios que se producen con la edad, por lo que cualquier “ataque” puede suponer una alteración en la homeostasis, y así, conducir a una situación de fragilidad [138]. También por este motivo, muchas de las enfermedades en el anciano se manifiestan como un cuadro confusional, ya que, ante un elemento estresor, los mecanismos que evitan el *delirium* no pueden actuar debido al rápido agotamiento de los mediadores de la inflamación.

Como se ha destacado previamente, el envejecimiento fisiológico implica un declive progresivo en las capacidades máximas de los tejidos, y esto se manifiesta en los diferentes órganos y sistemas.

A nivel cardiovascular disminuye la elasticidad de la aorta y otros grandes vasos, lo que aumenta el riesgo de hipertensión arterial y de enfermedad arterial coronaria, aunque es difícil de dilucidar el impacto que produce la edad cronológica en sí misma, al producido por la asociación de factores ambientales (reducción de la actividad física, sobrepeso, comorbilidades...). En el corazón, se reduce la frecuencia cardiaca basal y también la frecuencia cardiaca máxima, debido a pérdida de células de conducción así como a cambios anatómicos en las aurículas (y también los ventrículos); y además, se produce un acúmulo progresivo de calcio en las válvulas cardíacas [140]. Todo esto conlleva un mayor riesgo de accidentes vasculares y cardíacos

así como descompensaciones de insuficiencia cardiaca ante una situación de estrés [141].

En el sistema respiratorio disminuye también la elasticidad tisular y aumentan los depósitos de colágeno, con el consiguiente aumento del espacio muerto anatómico; y esto ocurre también a nivel de la pared torácica. A su vez la eficiencia del diafragma es menor. No obstante, si no hay comorbilidad, esto no conlleva asociada hipoxemia ni hipercapnia [142]. Por último, se altera la composición del surfactante pulmonar y existe mayor concentración de sustancias inflamatorias [143].

Uno de los sistemas en el que mayor impacto tiene el envejecimiento es el sistema nervioso central (SNC), y estos cambios se inician aproximadamente en la 6ª década de la vida. Con la edad, disminuye el volumen de masa encefálica así como el flujo vascular cerebral. Además de la pérdida neuronal (sobre todo en córtex y cerebelo), las neuronas remanentes exhiben una disminución de la densidad sináptica y del árbol dendrítico, así como de los receptores de neurotransmisores. Y aunque la neurogénesis es un mecanismo conservado durante toda la vida, no puede compensar la pérdida neuronal. Estos cambios son muy heterogéneos tanto en el mismo individuo como entre individuos [144]. Todo ello conduce a cambios cognitivos y de comportamiento incluso en el envejecimiento normal: los dominios más afectados son la memoria episódica y la ejecutiva, y además disminuye la velocidad de procesamiento de información, la capacidad de atención y la de concentración. De todos modos, en el individuo sano, esto no implica una mala

adaptación social, ya que pocas tareas requieren un alto rendimiento cognitivo [139].

El sistema hematopoyético mantiene un adecuado funcionamiento fisiológico con la edad, aunque desciende la masa de médula ósea y ésta es ocupada por grasa, lo que implica una disminución de las reservas funcionales hematopoyéticas. A su vez, las células progenitoras hematopoyéticas adquieren un mayor riesgo de mutaciones y por tanto, también de neoplasias hematológicas [145]. Y aunque ya se ha descrito que el número total de células circulantes no varía de forma significativa, sí se altera su funcionalidad. Pero en este ámbito, las alteraciones más relevantes son las que se producen en el sistema inmunológico con la edad, que globalmente se conocen como inmunosenescencia. Estos cambios no afectan por igual a todos los elementos del sistema inmune: sobre todo se han estudiado en las subpoblaciones de linfocitos T, y confieren un mayor riesgo de infecciones, neoplasias y enfermedades autoinmunes a la población anciana [146]. Además, se asocia a una pérdida de la regulación adecuada de los procesos inflamatorios, con un predominio de citoquinas y otras moléculas proinflamatorias, que generan un grado bajo, pero constante, de inflamación definido por Franceschi y denominado *inflammaging* [147]. Todo esto, será revisado de forma exhaustiva más adelante.

En su conjunto, puede haber una pérdida de entre el 30-50% de la masa muscular con la edad, predominantemente en miembros inferiores, aunque esto es muy variable y puede modificarse con la actividad física [148]. Este hecho junto con

procesos de denervación muscular conllevan una pérdida de fuerza. Del mismo modo, la presencia de citoquinas proinflamatorias promueve la degradación muscular [149]. Esto es de gran relevancia, porque la sarcopenia es un factor independiente de morbimortalidad en el individuo anciano [150]. También existe una pérdida progresiva del porcentaje de masa ósea, con lo cual, aumenta el riesgo de fractura y disminuye la capacidad de reparación ósea. A su vez, se reduce la cantidad y funcionalidad de los osteoblastos. No obstante, esto también puede mejorarse con entrenamiento de fuerza [151].

En el tracto gastrointestinal los efectos son moderados, por lo que el envejecimiento en sí mismo no origina desnutrición. Destaca la atrofia de la mucosa y la disminución del tono y motilidad de la musculatura intestinal. Esto promueve a nivel del colon, el estreñimiento, diverticulosis, así como un mayor riesgo de incontinencia fecal (por adelgazamiento del esfínter anal) [152]. También se ha descrito un mayor riesgo de cáncer colorrectal por distintos factores: se altera la barrera epitelial y esto promueve la translocación bacteriana y un estado proinflamatorio local; además, también hay cambios en la microbiota intestinal con la edad (y también con enfermedades relacionadas con el envejecimiento; lo que queda por discernir es si estas enfermedades alteran la microbiota o bien la alteración de la microbiota promueve estos estados patológicos) [153].

En cambio, en el sistema hepatobiliopancreático no se han descrito grandes cambios en la funcionalidad: en individuos sanos la producción de albúmina no se altera y aunque

disminuye la síntesis de factores de coagulación dependientes de vitamina K, esto no suele tener traducción clínica en el individuo sano. De todos modos, esto sí es importante si se presenta una patología hepática [154].

También existe disminución de la masa renal y reducción del número de glomérulos, así como glomerulosclerosis y alteraciones vasculares [155], lo que se traduce en una disminución del aclaramiento de creatinina, aunque con importante variabilidad interindividual. Esto, junto con la disminución de la capacidad para acidificar la orina, conlleva un mayor riesgo de toxicidad farmacológica [141]. La vejiga tiene menor capacidad de contractilidad y aumenta el riesgo de incontinencia e infecciones. A su vez, se producen cambios en los sistemas reproductores que interfieren en la función sexual, y sobre todo, en la función reproductiva [139].

Por último, la piel pierde elasticidad, sufre atrofia y pierde capacidad de reparación. También disminuye la capacidad de sintetizar vitamina D, cambia la microbiota cutánea y se acumulan células senescentes [156]. Todo esto además, se acentúa con mayor fotoexposición a lo largo de la vida.

En los órganos de los sentidos, se produce con elevada frecuencia presbicia, presbiacusia (con riesgo de aislamiento y de mayor deterioro cognitivo) y alteración en el olfato, y en menor medida, en el gusto (por disminución del número de neuronas en el área sensitiva del olfato principalmente) [141].

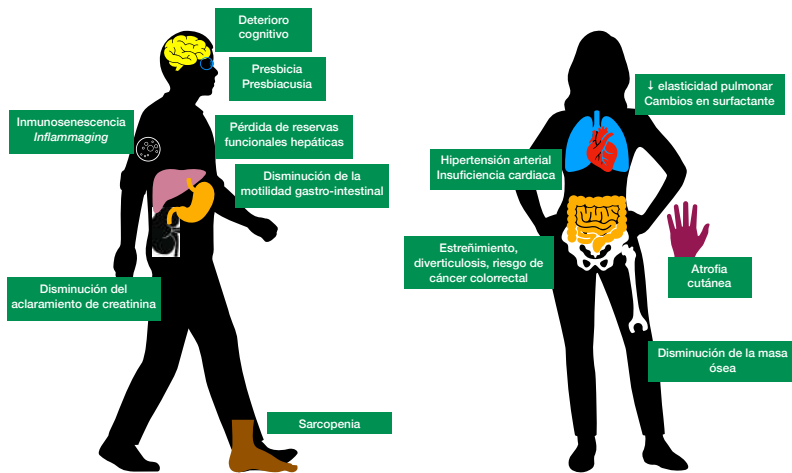


Figura 2. Principales cambios tisulares en el envejecimiento.

1.2.1. Biomarcadores del envejecimiento

Aunque estos cambios van produciéndose con la edad, no ocurren de forma sincrónica, por lo que la variabilidad en cada individuo es extremadamente relevante, y por ello existe un gran interés en encontrar biomarcadores y parámetros clínicos que permitan evaluar la situación global del paciente anciano así como poder predecir su longevidad.

Aunque sí se ha determinado que la ausencia de comorbilidad, la ausencia de dependencia funcional y la ausencia de deterioro cognitivo predicen una mayor esperanza de vida [157], existen también parámetros genéticos que, en el caso de los pacientes muy añosos y con situación de salud excepcional, pueden determinar hasta el 20-30% de la

variabilidad en cuanto a la longevidad (ej. polimorfismos en la proteína de transferencia de ésteres de colesterol, producción renal de la proteína *klotho*...) [158, 159]. De todos modos, además de estos factores genómicos, intervienen factores psicosociales y ambientales (como por ejemplo, la restricción calórica) a los que se han expuesto los individuos a lo largo de la vida [160, 161].

En este contexto, se ha desarrollado herramientas clínicas estandarizadas y reproducibles para distinguir, en los pacientes con la misma edad cronológica, los elementos que puedan influir en la edad biológica y las comorbilidades acompañantes que puedan condicionar estado funcional de los pacientes ancianos. Estos instrumentos, agrupados con la denominación de valoración geriátrica integral (VGI), recogen parámetros relacionados con el estado funcional, cognitivo, comorbilidad, polifarmacia, función psico-social, soporte social y estado nutricional y permiten clasificar a los pacientes ancianos en tres grupos: *fit*, vulnerables o frágiles [162–167].

Además de esto, se buscan biomarcadores analíticos, genómicos y transcriptómicos que ayuden a definir todavía de forma más precisa la trayectoria del envejecimiento de cada individuo. Se muestran como marcadores prometedores: moléculas relacionadas con la inflamación (IL-6, IL-8, IL-15, PCR y TNF α) [168], así como marcadores implicados en la función renal y hepática (creatinina, urea, albúmina) o con el metabolismo lipídico, que se asocian tanto al envejecimiento como al riesgo de enfermedad cardiovascular (colesterol y sus fracciones *high density lipoprotein* o HDL y *low density*

lipoprotein o LDL) [169]. Y a nivel intracelular y genómico, la presencia de especies reactivas de oxígeno, la longitud de los telómeros (aunque más que esto, se ha destacado la importancia de su funcionalidad), cambios epigenéticos como la metilación del ADN (conocidos como relojes epigenéticos), en el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) o modificaciones en las histonas e histona deacetilasas [141, 169]. La justificación de su relevancia se expondrá en la sección 1.3. *El envejecimiento a nivel celular y molecular.*

Pero debemos tener en consideración que dada la complejidad del proceso del envejecimiento, no puede existir un biomarcador único para definirlo, sino que, la combinación de una serie de parámetros clínicos, séricos, génicos y epigenéticos es la que podría generar escalas para mejorar la evaluación del individuo anciano.

1.3. El envejecimiento a nivel celular y molecular

Para entender qué hay detrás de todos los cambios a nivel tisular, vamos a analizar los mecanismos a nivel celular, y para ello hay que definir cuáles son los determinantes del envejecimiento.

Se han descrito tres grandes grupos de elementos caracterizadores del envejecimiento [170], que están representados en la figura 3.

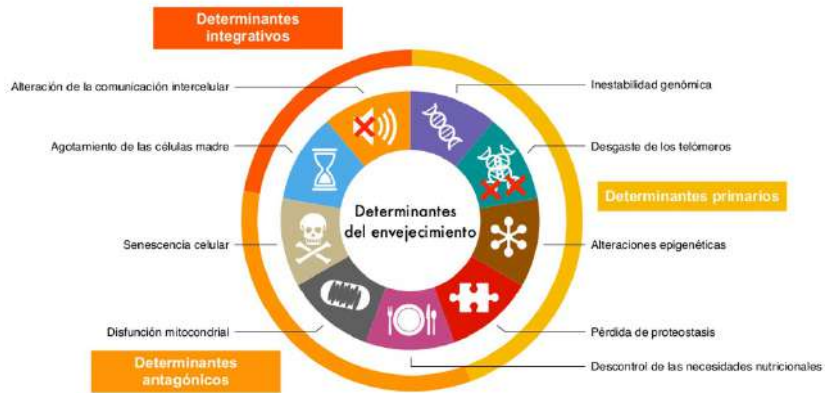


Figura 3. Determinantes del envejecimiento. Adaptado de López-Otín y otros [171].

Los determinantes primarios inducen daño celular y son: la inestabilidad genómica, el desgaste de los telómeros, las alteraciones epigenéticas y la pérdida de proteostasis (es decir, de la homeostasis proteica).

El segundo grupo lo componen la senescencia celular, la disfunción mitocondrial, con menor producción de moléculas de adenosín trifosfato (ATP), y la alteración en las funciones nutricionales con frecuencia asociado al aumento de masa grasa y pérdida de sensibilidad a la insulina y descenso de masa magra, así como disminución de algunas hormonas relacionadas con funciones nutricionales (como el factor de crecimiento insulina-*like* 1, IGF-1); éstas constituyen los determinantes antagónicos al daño generado por los primeros, y aunque en estadios iniciales son beneficiosos, a mayor escala acaban siendo elementos también deletéreos.

Por último, el agotamiento de las células madre y la alteración en la comunicación intercelular, son los determinantes integrativos, y constituyen los culpables finales del cambio fenotípico en los sujetos añosos que conlleva la pérdida de la funcionalidad y las reservas fisiológicas en diferentes órganos y sistemas [171].

De entre ellos, vamos a destacar la célula senescente, como uno de los protagonistas principales del envejecimiento. Estas células cumplen una función biológica, ya que la pérdida de capacidad proliferativa se considera necesaria para la homeostasis y remodelación tisular, y sobre todo para la prevención del crecimiento celular incontrolado, y de la generación de células tumorales [141, 169, 172].

Este concepto se acuñó en 1961, cuando Hayflick describió en base a sus experimentos que las células diploides tienen una capacidad limitada para la proliferación, incluso en presencia de nutrientes y espacio suficiente, que viene determinada por el acortamiento de los telómeros que se produce en cada replicación celular (límite de Hayflick) [173]. No obstante, la acumulación progresiva y aberrante de células senescentes en los tejidos con la edad, así como su capacidad para la secreción de moléculas proinflamatorias, citoquinas y otros factores potencialmente dañinos (conocido como el fenotipo secretor asociado a la senescencia) [174], inducen la generación de especies reactivas de oxígeno, que pueden ocasionar daño en el ADN, producen modificaciones relevantes en el microambiente, promueven la angiogénesis, y en su conjunto, y producidas de forma crónica favorecen el *inflammaging*;

elementos que constituyen algunos de los determinantes en el desarrollo del cáncer [175] y otras enfermedades asociadas al envejecimiento, como la aterosclerosis o las enfermedades neurodegenerativas.

Aunque se ha intentado definir biomarcadores para la detección de la senescencia celular, de nuevo su complejidad, así como la heterogeneidad en la presentación en los diferentes tejidos, no permiten que existan por el momento, aunque se postulan algunas de las moléculas producidas por estas células, para detectar el fenotipo secretor asociado a la senescencia celular (IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, CCL3, CCL4 y factores de crecimiento como la activina A) [169]. No obstante, su especificidad es baja, dado que son comunes a otros eventos del envejecimiento como el *inflammaging* además de que se producen también en situaciones patológicas. Y es importante reconocer que el aumento de células senescentes puede producirse no solamente con la edad, sino también como alternativa adaptativa a la apoptosis ante ciertos factores, como oncogenes u otros elementos agresores como el estrés oxidativo.

1.4. Inmunosenescencia

1.4.1. Definición

El concepto de inmunosenescencia, hace referencia a los cambios que se producen en los diferentes compartimentos inmunológicos con la edad [176] (lo cual no quiere decir que las

células adquieran una replicación senescente). Aunque los cambios más marcados ocurren en el sistema adaptativo (sobre todo en los linfocitos T) existen también modificaciones en el sistema innato. De hecho, otro concepto muy ligado a la inmunosenescencia es el *inflammaging* que, como se ha descrito previamente, consiste en un estado proinflamatorio de bajo grado crónico con aumento de citoquinas proinflamatorias, y que puede comportar también un aumento del número de neutrófilos y de células NK (aunque funcionalmente alterados). En este contexto, las barreras como la mucosa gastrointestinal son más permeables y puede existir leve translocación bacteriana de la microbiota intestinal que se supone que perpetuaría también este estado de inflamación.

Los determinantes básicos de la inmunosenescencia son: la reducción de la capacidad para la respuesta a nuevos antígenos por la disminución de células *naïve*; el aumento de las células de memoria; y el estado de inflamación crónica de bajo grado denominada *inflammaging* [177, 178]. Ambos procesos están íntimamente relacionados y se potencian, ya que la presencia de células del sistema inmune con menor funcionalidad, implica una menor eliminación de células somáticas senescentes, lo cual contribuye al *inflammaging*, y por otro lado, este estado de inflamación crónica, constituye un estímulo constante de las células del sistema inmunológico que puede llevar a alteraciones en su funcionalidad e incluso su agotamiento [179].

Aunque clásicamente se ha descrito como una pérdida de la funcionalidad del sistema inmune, los cambios que se producen son muy complejos y no del todo conocidos, además de que

recientemente se ha descrito que, lejos de representar una situación puramente desfavorable, podrían constituir una situación adaptativa para el individuo anciano.

De todos modos, la inmunosenescencia no puede explicarse solamente por el envejecimiento celular ya este “envejecimiento inmunológico” no está relacionado siempre con pacientes de edad más avanzada, sino que está influenciado por múltiples factores, como se describirá a continuación.

1.4.2. Marcadores de inmunosenescencia

El estudio de los cambios producidos en el sistema inmune con la edad ha ganado una gran atención, con el objetivo de intentar encontrar biomarcadores que permitan definir su desarrollo con precisión, y también para encontrar posibles dianas terapéuticas con el propósito de revertirlo. No obstante, conseguir un pequeño grupo de biomarcadores de inmunosenescencia es un gran reto debido a la complejidad de los cambios y la controversia en cuanto a sus efectos clínicos en el individuo. Del mismo modo, los cambios para intentar “rejuvenecer” el sistema inmune en el paciente anciano podrían causar situaciones iatrogénicas de las que no conocemos las consecuencias.

En este contexto se propuso el *Immune Risk Profile*, caracterizado por la inversión de la ratio CD4/CD8 (<1), un descenso de los linfocitos B y la seropositividad para CMV. Esto, asociado a niveles elevados de IL-6 se ha relacionado con peor

evolución y mayor riesgo de mortalidad en pacientes ancianos (en los estudios OCTA y NONA) [180]. Este índice no incluía el número de células *naïve*, sino que se centraba en la presencia de mayor número de CD8⁺ con diferenciación terminal, ya que las primeras no se consideraron relacionadas con una peor evolución clínica. No obstante, se han encontrado resultados opuestos en diferentes poblaciones [181–183].

Por otro lado, se ha descrito recientemente una firma inmune, denominada IMM-AGE [184], cuyos hallazgos en cuanto a la evolución del sistema inmune de forma longitudinal en el individuo, se han correlacionado más con la longevidad que la edad cronológica. Entre otros datos, encontraron que las células CD8⁺ inmaduras descendían de forma progresiva con el paso de los años, en la población anciana, aunque existía gran variabilidad interindividual. No obstante, en el grupo de pacientes jóvenes, los subtipos celulares se mantuvieron bastante estables.

Aunque no podemos afirmar que exista un grupo definido de biomarcadores de inmunosenescencia, con clara relevancia clínica, sí se pueden describir los cambios conocidos que se han descrito con la edad en el sistema inmune innato y adaptativo y que esto nos permita guiar la investigación al respecto, ya que aunque se den en diferente grado, todos los compartimentos de este sistema van a verse afectados de algún modo.

1.4.2.1. Cambios en la inmunidad innata con la edad

Uno de los primeros elementos que se altera con la edad son las barreras epiteliales: tanto la piel, como el tubo digestivo y el sistema respiratorio sufren un adelgazamiento de la capa epitelial, disminución de otros elementos protectores (como pelos o cilios), así como una reducción de las células inmunitarias a nivel local, con la consiguiente translocación de mayor número de bacterias [185].

Como concepto global en cuanto a los cambios en la inmunidad innata, se ha encontrado una activación basal crónica del mismo, y por otro lado, ante eventos específicos en los que se necesita una respuesta aguda (por ejemplo, para la producción de radicales libres), el sistema inmune innato es menos efectivo.

El primer hecho es el denominado *inflammaging*, y en éste influyen distintos factores: por un lado, la senescencia de células somáticas y la secreción de citoquinas (relacionadas con el fenotipo secretor de célula senescente que promueve la quimiotaxis de células inflamatorias), la disfunción mitocondrial excesiva, la presencia de restos celulares, y la disbiosis en la microbiota intestinal (junto con el paso de dichos microorganismos al torrente sanguíneo por alteraciones en la barrera epitelial), así como la presencia de infecciones latentes por virus (entre las que destaca la producida por CMV) [186].

A esto se puede asociar un aumento excesivo del estrés oxidativo que no pueda llegar a contrarrestarse. Esto se explica en parte por el conocimiento que se tiene del entrenamiento de

la inmunidad innata (por cambios epigenéticos producidos por estimulación antigénica previa). Aunque parezca contradictorio, este estado de actividad celular puede ser también beneficioso en el envejecimiento, siempre que existan moléculas antiinflamatorias capaces de mantenerlo bajo control cuando no hay ningún proceso que combatir (esto se observa en los individuos centenarios, que poseen un alto grado de *inflammaging*, pero con moléculas que lo contrarrestan) [146, 187]. No obstante, puede llevar al desarrollo de patología cuando se escapa a este control, es decir, la clave será la homeostasis. De hecho, se han descrito polimorfismos que implican un aumento en la producción de IL-6 (proinflamatoria) y que se relacionan con una menor longevidad (mientras individuos con polimorfismos que aumentan la expresión de IL-10 tienen más probabilidad de llegar a ser individuos centenarios) [188].

También los niveles de PCR pueden contribuir a este hecho, mediante la unión al receptor CD32/CD64, con la consiguiente activación del factor nuclear kappa B (NF-κB) que induce inflamación y posterior fibrosis tisular progresiva a nivel global, y promueve el fenotipo secretor asociado a la senescencia [189] y se ha relacionado con mayor mortalidad y fragilidad [179].

A nivel celular, los componentes de la inmunidad innata son principalmente los neutrófilos, el sistema monocito/macrófago, las células dendríticas y las células NK acompañadas de múltiples citoquinas. En estas células, los cambios con la edad son menos conocidos que los que se producen en los componentes del sistema inmune adaptativo y básicamente

hacen relación a su funcionalidad, lo que es más difícil de determinar en un contexto clínico habitual. Esto se ha determinado mediante los cambios en la expresión de diferentes moléculas de TLR en diferentes células del sistema inmune innato, así como el análisis a nivel proteómico y transcriptómico.

En cuanto a los neutrófilos, muchas de sus funciones se muestran alteradas (quimiotaxis, muerte intracelular y producción de radicales libres), sobre todo, queda alterada su capacidad para producir NETs, lo que conlleva mayor susceptibilidad a algunas infecciones bacterianas, así como mayor dificultad para la reparación tisular tras el fin del proceso inflamatorio agudo. Además en algunos casos se ha descrito un aumento relativo en el número de neutrófilos en el paciente anciano, aun manteniéndose en rango normal [185].

También se ha descrito cierta disfunción relacionada con la edad en el sistema monocito-macrófago: existe disminución de la expresión de receptores coestimuladores como CD80 o CD86, mientras que aumenta la expresión de PD-L1 que se une al receptor PD-1 de los linfocitos T e induce su inactivación [190]. Por otro lado, se ha propuesto que en muchos tejidos, debido al *inflammaging*, predomina la diferenciación macrofágica M2, lo que conlleva un aumento de la inflamación local y aumento de marcadores de senescencia. A su vez, la secreción de citoquinas inflamatorias es mucho mayor que en individuos jóvenes, sobre todo de IL-6. También aumenta la proporción de DC inflamatorias (que expresan CD16), pero con una menor capacidad de fagocitar antígenos [186].

Por último, los linfocitos NK tienen una función importante en la destrucción de células infectadas por virus y en las células tumorales que globalmente está disminuida, pero un aumento del número de células NK compensa esta alteración [191]. Existen dos poblaciones distintas en función de la expresión de CD56: con la edad, disminuye la población CD56^{bright} y aumenta la población que expresa CD56^{dim}. Este último subgrupo tiene una expresión aumentada de CD57 y representa una población de células NK muy diferenciada [192, 193]. Ésta tiene una vida media mayor, una disminución de la respuesta proliferativa pero una función citotóxica dependiente de CD16 conservada aunque con una aparente menor actividad directa sobre células infectadas o tumorales. La redistribución de estas poblaciones puede contribuir también en la respuesta adaptativa e inmune de otras células ya que juegan un papel en la activación de las células dendríticas e interactúan con monocitos promoviendo la inflamación.

De cualquier modo, hay que tener en cuenta que en general, en el sistema inmune las interacciones son complejas y el sistema innato y adaptativo actúan conjuntamente en muchas ocasiones. Es más, se ha descrito recientemente que en el proceso de inmunosenescencia, la barrera (que siempre ha sido teórica) entre las células del sistema inmune innato y adaptativo se diluye.

1.4.2.2. Cambios en la inmunidad adaptativa con la edad

La inmunidad adaptativa está formada principalmente por linfocitos T ($\alpha\beta$ y $\gamma\delta$) y B, pero requiere la participación de células del sistema innato. Se ha destacado ya que los cambios más significativos que se producen en el sistema inmune con la edad, se dan en la inmunidad adaptativa y en especial en la distribución y diferenciación de las células T. Cabe recalcar por tanto, que la organización clásica de linfocitos T $\alpha\beta$ en CD4⁺, y CD8⁺ se ha visto superada por una subclasificación mucho más completa.

Las células T, principalmente CD8⁺ se han dividido en 4 poblaciones principales con un número limitado de marcadores de superficie (CD28, CD27, CCR7 y CD45RA) [126], que están representadas en la figura 4:

- ▷ Linfocitos inmaduros o *naïve* (N): CCR7⁺, CD27⁺, CD28⁺, CD45RA⁺.
- ▷ Linfocitos centrales de memoria (CM): CCR7⁺, CD27⁺, CD28⁺, CD45RA⁻.
- ▷ Linfocitos efectores de memoria (EM): CCR7⁻, CD27[±], CD28[±], CD45RA⁻.
- ▷ Linfocitos efectores de memoria con diferenciación terminal y reexpresión de CD45RA (TEMRA): CCR7⁻, CD27⁻, CD28⁻, CD45RA⁺.

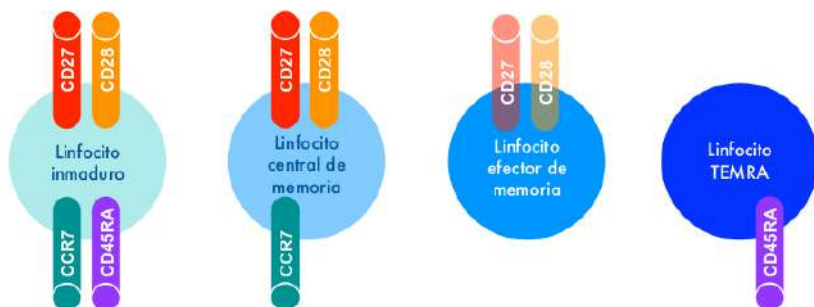


Figura 4. Representación de los marcadores de membrana de los diferentes subtipos de linfocitos T según su estadio madurativo.

Esta pérdida progresiva de marcadores se supone que condiciona una pérdida de funcionalidad, aunque se sabe que la relación no es directa. El marcador CD28 es un coestimulador asociado a TCR que se une a proteínas de la familia B7 [194]. En condiciones de señalización inflamatoria repetitiva se pierde su expresión y esto se relaciona con el acortamiento de los telómeros y menor actividad de telomerasa [126].

El marcador CD27 se une específicamente con CD70 y es un importante modulador de la función de células T, estimulando su activación, proliferación y supervivencia (figura 5). Se ha observado que la pérdida de expresión de CD27 es posterior a la de CD28, implica disminución de la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ y se correlaciona más con la disminución de la actividad de los telómeros [195, 196]. Por tanto, la pérdida de los correceptores CD28 y CD27 se considera indicativo de reducción de la función de los telómeros en las células T y denota progresión hacia una replicación senescente.

Además las células más diferenciadas pueden expresar también con frecuencia otros marcadores: CD57, KLRG1 y PD-1 [126, 127] que se asocian a una respuesta pobre a los estímulos. Sobre todo PD-1 se relaciona con un sistema inmune exhausto pero también parece que al bloquearlo con un anticuerpo podría reestablecer la funcionalidad celular mediante la producción de citoquinas [197, 198]. Otras en cambio, no los expresan, y adquieren un estado de replicación senescente, secretando también moléculas del fenotipo secretor de célula senescente y contribuyendo al *inflammaging* y al agotamiento inmunológico. Por otro lado, la expresión de CD57 también se asocia a un fenotipo de célula senescente, incluso en células que expresan CD28 [199]. Esto sugiere que el “agotamiento inmune” podría ser reversible, mientras que la replicación senescente no, por lo que deben ser claramente diferenciadas.

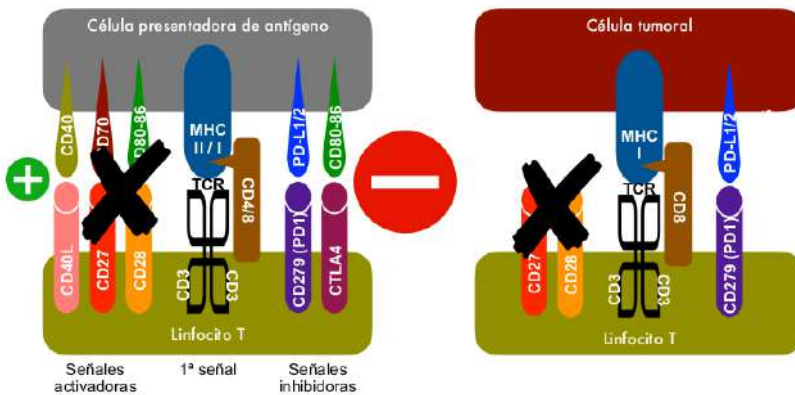


Figura 5. Representación de la actividad del sistema inmune exhausto contra una célula tumoral, en la que predominan las señales inhibitorias.

Aunque globalmente estos cambios se han relacionado con una pérdida de funcionalidad, mediada por estos marcadores y la disminución de la respuesta del TCR, de forma llamativa, se ha visto que algunos linfocitos EM mantienen su funcionalidad, y esto es debido a la expresión de moléculas de membrana comunes a células del sistema inmune innato [200], que les permiten responder a estímulos antigénicos de forma no específica e independiente del TCR [201], lo cual denota de nuevo la complejidad de este proceso. Aunque esto se ha relacionado con la inmunovigilancia contra células anómalas, también tiene implicación en enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes.

En definitiva, los eventos que se producen con la edad, incluso en ancianos sanos, incluyen un aumento de las células de memoria y muy diferenciadas (en las que puede existir una replicación senescente), y en muchos casos, una disminución de la proporción de linfocitos T inmaduros (o N) (aunque esto es más controvertido), principalmente en la subpoblación de CD8⁺ [202].

Los dos factores que condicionan estos cambios son la involución tímica con la consiguiente reducción de la producción de linfocitos *naïve* y con menor variabilidad del TCR [203, 204] y principalmente la exposición repetida a patógenos a lo largo de los años. La involución del timo se produce a partir de la pubertad, y supone, en principio, una adaptación deseable, ya que se trata de un órgano de alta demanda energética; además de que, en condiciones habituales, el individuo se habrá expuesto a casi la totalidad de los patógenos presentes en su

entorno durante la infancia y la pubertad, por lo que se habrían generado suficientes linfocitos capaces de activarse de forma específica con su TCR, contra los patógenos que puedan amenazar la integridad del organismo. Con lo cual, no tendría sentido mantener dicho órgano activo transcurrido ese tiempo. Además, algunas de las células T inmaduras pueden replicarse sin perder su fenotipo de células inmaduras, y aunque esto no compensa totalmente la involución tímica, permite mantener la homeostasis inmune [205]. Por otro lado, existe menor capacidad de reconocimiento de células T autorreactivas, con lo cual, hay mayor susceptibilidad para las patologías autoinmunes; además de que contribuyen a perpetuar el estado de inflamación crónica sistémica. Todo esto está en consonancia con una adaptación del individuo respecto a su historia de exposición a antígenos.

Por otro lado, a nivel funcional, el fenotipo predominante es el Th2 (antiinflamatorio, que induciría menor capacidad para combatir infecciones), pero también Th17 (proinflamatorio, cuya presencia se ha relacionado con fenómenos de autoinmunidad). Pero además, se han descrito cambios metabólicos y epigenéticos: por ejemplo, las mitocondrias disfuncionales de los linfocitos T en el individuo anciano inducen un estado de anabolismo secundario al déficit energético, lo que conlleva una disminución de su funcionalidad. También se han descrito modificaciones en la señalización celular dependiente de la unión de TCR al CMH de las células presentadoras de antígeno [206], que no van a ser objeto de estudio en este trabajo, pero ayudan a comprender que incluso cuando se produce esta unión

entre linfocitos T y CPA, la alteración en la regulación de la cascada de señalización intracelular influirá también en la funcionalidad, proliferación y diferenciación de las células T.

Los datos que hemos visto hacen referencia fundamentalmente a los linfocitos CD8⁺, y aunque los marcadores de CD4⁺ son comunes en muchos casos existen también marcadores distintivos. Por ejemplo, las células *naïve* expresan también CD31 que se relaciona con telomerasas largas y baja o nula historia de proliferación en linfocitos CD4⁺ [126].

El subgrupo de linfocitos T CD4⁺ reguladores se caracterizan por la expresión de CD25 y FOXP3 y se encargan de controlar tanto el sistema inmune innato como el adaptativo; una de sus funciones principales es regular la función de las células presentadoras de antígeno. La mayoría de datos muestran un aumento del número de CD4 T reguladores con la edad [207], y además un aumento (o al menos mantenimiento) de su funcionalidad [208]. Además, existen datos que sugieren que linfocitos CD4⁺ CD25⁻ (no reguladores) también adquieren capacidad inmunosupresora en los ancianos, y promueve la homeostasis para controlar el *inflammaging*, pero esto explicaría, por ejemplo, una menor respuesta inmune ante el cáncer. Así mismo, existe un *pool* de CD8⁺ reguladores diferenciados (FOXP3⁺ CD28⁻), mucho menos abundante y menos estudiado que el de linfocitos CD4⁺, también tiene un papel en el control de la respuesta inmune [209] y aumenta con el envejecimiento.

En la subpoblación de los linfocitos T $\gamma\delta$ destaca una reducción de los linfocitos T $V\delta 2^+$ atribuido a la involución tímica; pero su funcionalidad queda altamente preservada. Además, la subpoblación $V\delta 1^+$ no disminuye de forma significativa con la edad [210, 211], aunque esto puede alterarse por otros factores (como la infección por CMV).

En cuanto a la población de linfocitos B ($CD19^+$), aunque los datos no son del todo consistentes, globalmente se ha observado que existe un descenso de linfocitos B con la edad, tanto de su recuento total como de las células *naïve*, por un descenso en la producción celular en la médula ósea. Acompañando a este descenso, disminuye la variabilidad del BCR, aumenta el número total de las células B diferenciadas, aunque no siempre de forma significativa [212–214]. También se reduce la producción de anticuerpos IgM principalmente, aunque pueden aumentar los niveles de IgG e IgA [185]. De todos modos, la magnitud de este cambio es mucho menor que en el caso de los linfocitos T. Y esto, junto con la variabilidad en los puntos de corte para la clasificación de individuo joven vs anciano, podría explicar la ausencia de completo consenso en cuanto a su modulación con la edad.

Para concluir, con toda la evidencia descrita, los hallazgos más consistentes en relación con el proceso de inmunosenescencia [215] podrían ser:

- Elevación de marcadores inflamatorios (dentro del fenómeno del *inflammaging*), entre los que destaca la IL-6 (y que sí se ha relacionado con fragilidad y mortalidad).

- ▶ Aumento de las células CD8⁺ CCR7⁻ CD27⁻ CD28⁻ CD45RA⁺ (TEMRA). Su papel patológico no está demostrado, y sí se sabe que son responsables de la inmunovigilancia de infecciones latentes.
- ▶ Descenso de las células CD8⁺ CCR7⁺ CD27⁺ CD28⁺ CD45RA⁺ (*naïve* o inmaduras). Aunque este hecho no se ha descrito de forma universal, sí es ampliamente reconocido; pero no se ha podido demostrar que esto tenga una traducción patológica en el envejecimiento.
- ▶ Aumento de los linfocitos reguladores CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ (o CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low}).
- ▶ Defectos en la inmunidad humoral.

De todos modos, nunca debe perderse de vista que las modificaciones se dan en todos los compartimentos del sistema inmune (tanto a nivel fenotípico como molecular y funcional); además, la relevancia clínica de estos cambios, así como la incidencia de los mismos va a depender del contexto ambiental en el que se desarrolle y viva el individuo [216], y no siempre va a ir asociado a un déficit en la función inmunitaria.

De hecho, se ha conseguido aumentar la efectividad de algunas vacunas en individuos añosos con potenciadores del sistema inmunológico; del mismo modo, se ha visto que los pacientes ancianos con cáncer pueden responder también a los tratamientos con inmunoterapia.

1.4.3. Factores moduladores en el desarrollo de inmunosenescencia

Aunque ha quedado patente que un factor clave en el desarrollo de la inmunosenescencia es el paso del tiempo, el sistema inmunológico es ubicuo en el organismo e interacciona con otros múltiples órganos y sistemas, principalmente con el sistema endocrino, metabólico y el sistema nervioso, entre otros. Por todo ello, y por su plasticidad, tiene sentido biológico que existan distintos elementos que puedan influir en la evolución dinámica que se produce en el sistema inmune a lo largo de la vida. En concreto, puede verse afectado por la historia antigénica del individuo, las agresiones ambientales, la comorbilidad y los fármacos empleados, así como el estado nutricional y la presencia de patógenos y otros tipos antigénicos latentes.

Debe tenerse en cuenta, que todos estos cambios han sido descritos principalmente en población occidental, de nivel educativo medio-alto, en sociedades industrializadas y desarrolladas económicamente y democráticas (conocidas como *WEIRD: Western, educated, industrialized, rich, democratic*); no obstante, existe evidencia de que otras sociedades en vías de desarrollo, y cuya exposición antigénica en la infancia y juventud es mucho mayor, presentan cambios relacionados con la inmunosenescencia a edades más tempranas (alrededor de los 50 años) [217, 218]. Esto fue demostrado en un estudio en Pakistán, y pone en evidencia que no es sólo la edad cronológica la que determina el desarrollo de

la inmunosenescencia, sino que otros factores, como el nivel socioeconómico del individuo puede tener un papel en su desarrollo.

A continuación, se ampliará la evidencia existente de la influencia de las infecciones crónicas y el estilo de vida en la inmunosenescencia.

1.4.3.1. Papel de la infección por citomegalovirus (CMV)

Una de las posibles causas más estudiadas de los cambios que se producen en el sistema inmune es la estimulación permanente del mismo por antígenos de herpesvirus, en especial por CMV. Este virus ha desarrollado la capacidad de evasión inmunológica mediante la modulación del mismo, persistiendo así en el individuo como una infección latente, y provocando un efecto marcado sobre la diferenciación y composición de los linfocitos T. La activación del sistema inmune conduciría en este caso a un agotamiento del mismo con un predominio de linfocitos con diferenciación terminal o exhaustos [219, 220], además, específicamente dirigidos contra este virus. Esto es sobre todo importante en el paciente anciano porque la infección por CMV aumenta con la edad, y tiene una gran prevalencia en los pacientes de edad avanzada en países desarrollados.

Aunque todavía existen muchos puntos por aclarar, en términos generales se ha visto que la infección por CMV conduce o al menos incrementa los efectos de

inmunosenescencia, incluso en individuos jóvenes con IgG positiva para CMV, tanto en el compartimento de CD8⁺ como CD4⁺ (con aumento de células con diferenciación terminal: CD8⁺ CD27⁻ CD28⁻ CD45RA⁺) [221]. No obstante, no existe evidencia fehaciente de que esto suponga una desventaja inmunológica para los individuos en la población general [222, 223].

De nuevo, aunque estos cambios son más prominentes en el subgrupo de linfocitos T αβ, la exposición a la infección crónica por CMV también parece alterar la función de los linfocitos B, así como linfocitos T γδ [224] (éstos tienen un papel en el control vírico por lo que puede llegar a expandirse la población Vδ2⁻ Vδ1⁺); aunque los mecanismos subyacentes son mucho menos conocidos.

Por toda esta evidencia, es importante su determinación tanto en los pacientes jóvenes como en los ancianos porque podría actuar como un factor de confusión en el estudio de la inmunosenescencia.

1.4.3.2. Influencia del estado nutricional y el estilo de vida en el sistema inmune

Los efectos de la malnutrición en las funciones inmunitarias han sido establecidos en diferentes estudios, y en los últimos años se ha visto que la malnutrición asociada a la edad contribuye a un estado de inmunodeficiencia. Es importante destacar que existen dos formas de malnutrición: la desnutrición y la obesidad.

Por un lado, los pacientes ancianos tienen una mayor frecuencia de déficit de nutrientes, debido a una menor ingesta y por alteraciones en los requerimientos nutricionales y en la absorción. Esto se ha visto relacionado con un aumento del riesgo de infección y de mortalidad, que se debe a una menor reactividad del sistema inmune ante una agresión [225–227]. También se produce esta disfunción del sistema inmune en individuos con un índice de masa corporal (IMC) bajo.

Por otro lado, la obesidad es una condición cada vez más frecuente en nuestra sociedad y se ha relacionado prácticamente con la incidencia de todos los tipos de tumores y otras muchas enfermedades. El aumento de la grasa corporal, en especial de localización abdominal, produce un aumento del estado inflamatorio tanto a nivel local (existe abundante presencia de células inflamatorias en el tejido adiposo que producen citoquinas proinflamatorias), como sistémico (mediada por este aumento de citoquinas proinflamatorias como IL-6, estimulada por la secreción de leptina; y disminución de moléculas antiinflamatorias como IL-10) [228, 229]. Como ya se ha descrito, este estado proinflamatorio induce un “agotamiento inmunológico” con un aumento de linfocitos T (y también B) con diferenciación terminal, sin capacidad proliferativa y con menor reactividad a las agresiones. Pero además, globalmente, existen muchas circunstancias que pueden inducir la expresión de NF- κ B relacionadas con la alimentación y el estilo de vida además de la obesidad, como son el estrés psicológico, el déficit de vitamina D o la alteración del ritmo vigilia-sueño, entre otros.

Además, recientemente se ha resaltado la importancia del ejercicio físico como modulador de la inmunosenescencia. Este hecho se debe a que el tejido muscular es capaz de generar sustancias antiinflamatorias y protectoras del sistema inmune denominadas mioquinas, y que se generan con la actividad física [230], y que por tanto contribuyen a prevenir enfermedades crónicas. Se ha demostrado que esto, incluso ayuda al mantenimiento de las células T inmaduras, y reduce la formación de células con diferenciación terminal y exhaustas [231, 232]. Además, contribuye a reducir el tejido adiposo. Por todo ello, es de vital importancia que los individuos ancianos mantengan la actividad a un nivel que suponga un gasto energético para el organismo.

Por otro lado, se ha demostrado que la restricción calórica (en individuos sanos) interviene en múltiples vías de señalización relacionadas con la inflamación (mTOR, NF- κ B, MAPK...), y también es capaz de reducir la producción de especies reactivas de oxígeno; y por tanto puede contribuir a contrarrestar la inflamación crónica (o *inflammaging*). Además, se ha descrito que puede contribuir a mantener la producción de células T *naïve* y por tanto, de la diversidad del TCR. De hecho, esta es una de las intervenciones más prometedoras para conseguir un envejecimiento fisiológico (frente al envejecimiento patológico) [233]. Con estos datos, recientemente se ha propuesto que las intervenciones individualizadas en cuanto a los hábitos nutricionales y de actividad física deberían promoverse como moduladoras de cambios epigenéticos que influyan en la evolución del sistema inmunológico [232, 234].

1.4.4. Implicaciones de la inmunosenescencia

La convergencia de todos estos cambios (aunque deben ser interpretados con cautela), se ha relacionado con un aumento del riesgo de infecciones severas, enfermedades autoinmunes, patología cardiovascular, enfermedades neurodegenerativas y cáncer, entre otras patologías. Éstas van a producirse cuando las defensas antioxidantes y antiinflamatorias no logren contrarrestar los efectos de las especies reactivas y las moléculas proinflamatorias. A continuación se desarrollará la relación de la inmunosenescencia con dichas patologías.

En primer lugar, se ha descrito una disminución de la efectividad de las vacunas. Sobre todo ante patógenos contra los cuales el individuo nunca había sido expuesto (como la fiebre amarilla o la infección por SARS-CoV2) [215, 235]. Esto también implicaría una mayor susceptibilidad para padecer infecciones graves (incluso fatales) ante estos mismos microorganismos, debido a la disminución de células T *naïve* y la consiguiente reducción de la variabilidad del TCR, así como a alteraciones en la funcionalidad de las DC [202]. Por esto, los estudios basados en la vacuna de la gripe, muestran datos diferentes a los obtenidos con patógenos a los que el individuo no ha sido expuesto previamente.

A su vez, puede producirse la reactivación de infecciones latentes: el agotamiento del sistema inmune al intentar contener una infección crónica, puede conllevar un sobrecrecimiento del patógeno presente en el organismo. Esto puede, puede suponer un gran reto, sobre todo si se produce simultáneamente el

contacto con un neoantígeno, bien por un proceso infeccioso, o por antígenos producidos por las células tumorales. Por ello, en el contexto de una infección aguda, o de una neoplasia sólida o, especialmente, hematológica, no es infrecuente que se produzca la reactivación de infecciones por herpesvirus latentes [202]. Y en sentido opuesto, este agotamiento del sistema inmune para controlar una infección crónica, podría dificultar el control de una infección aguda o el cáncer.

Por otro lado, muchas enfermedades neurodegenerativas se han relacionado con el estado de inflamación crónica que existe con el envejecimiento [236]. La presencia de linfocitos Th1 que pueden cruzar de forma más fácil la barrera hematoencefálica (BHE) desde el torrente sanguíneo aumenta la inflamación local; del mismo modo, la secreción de moléculas inflamatorias relacionadas con el fenotipo senescente por parte de células del SNC promueve también el daño cerebral que se ha relacionado con el desarrollo de algunas enfermedades neurodegenerativas, el enlentecimiento psicomotor, alteraciones emocionales y el deterioro cognitivo. Entre ellas, destaca la enfermedad de Alzheimer (en la que el acúmulo de proteínas anómalas de β -amiloide perpetúa el estado de inflamación crónica e induce el agotamiento del sistema inmune, con una mayor presencia de células con diferenciación terminal y menor capacidad para la eliminación de dichas proteínas); pero también tiene papel en la enfermedad de Parkinson y en el daño tisular producido tras un accidente cerebral vascular agudo. Aunque los linfocitos T reguladores están aumentados en el individuo anciano, su capacidad neuroprotectora disminuye, sobre todo porque se

sitúan preferentemente en el plexo coroideo, y presentan una disminución de la migración al parénquima del SNC [237].

La aterosclerosis es una enfermedad con un componente inflamatorio muy relevante, y relacionada con las enfermedades cardiovasculares y la obesidad. La apolipoproteína B es uno de los agentes causales de las placas de ateroma; que, actúa como DAMP en la capa íntima de la pared arterial, atrayendo así a los macrófagos, que son las principales células responsables de la aterosclerosis. Además, las células T con diferenciación terminal ($CD8^+ CD27^- CD28^-$) producen citoquinas y sobre todo IFN- γ , que induce la activación de dichos macrófagos. La rotura de las placas de ateroma es el agente causal de los eventos coronarios agudos, cuya incidencia es mayor con la edad. Por último, el estado proinflamatorio en el tejido adiposo contribuye a la resistencia a la insulina y por tanto al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, que a su vez es un factor de riesgo para los eventos cardiovasculares [236].

También se ha observado un aumento de la incidencia de enfermedades autoinmunes con la edad, y predominantemente en mujeres (por las diferencias endocrinológicas). Además del contexto inflamatorio crónico, destaca la mayor presencia de linfocitos T autorreactivos que no han podido ser eliminados en el timo. Pero además, la exposición antigénica previa a virus y algunas bacterias también puede contribuir a este hecho en individuos susceptibles, mediados por la producción de alteraciones epigenéticas [238].

Por último, la presencia de inmunosenescencia disminuye la capacidad del sistema inmune para ejercer la función de inmunovigilancia contra células anómalas que puedan convertirse en tumorales; y además de esto, el estado de inflamación crónica promueve en el microambiente tumoral el crecimiento y progresión del cáncer [239]. Esto se desarrollará en profundidad en la sección 1.5. Envejecimiento, sistema inmune y cáncer.

Incluso así, debe tenerse en consideración que esta inmunomodulación dinámica puede ser adaptativa para el individuo o incluso tener efectos positivos en algunos contextos; por otro lado, las mismas modificaciones en otro contexto ambiental, en diferentes individuos, o en diferentes edades, pueden suponer una amenaza [240]. Y aunque se cree que deben existir también alteraciones cuyo efecto sea patológico bajo cualquier circunstancia, esto está todavía por definir, ya que muchos de estos cambios son indispensables para la supervivencia del individuo. Y por todo ello, es interesante estudiar también otros eventos concurrentes y la situación clínica y funcional del individuo en conjunción (o previamente) a los cambios de la inmunosenescencia.

1.5. Envejecimiento, sistema inmune y cáncer

Desde la descripción del límite de Hayflick, se ha considerado que la senescencia celular tiene un papel crucial en el desarrollo del cáncer, ya que mientras que las células

senescentes tienen un acortamiento de los telómeros y escasa capacidad proliferativa [173], en las células tumorales existe activación importante de las telomerasas asociada a numerosas mutaciones. Éstas pueden ir acumulándose a lo largo de la vida en el individuo, y esto junto al fallo progresivo de los mecanismos de control, favorecer el crecimiento descontrolado de alguna de estas células y generar una neoplasia.

Como hemos visto, la caracterización del sistema inmunológico en el individuo anciano, enmarcado en su contexto ambiental, permitiría desentrañar las claves del envejecimiento fisiológico y la longevidad, con ausencia de enfermedades relacionadas como son las neoplasias. Y también en el desarrollo del cáncer, la clave, radicará en la homeostasis, es decir, el equilibrio entre los elementos pro- y antiinflamatorios; los ataques al sistema inmune y su defensa.

El sistema inmunitario en el contexto de una neoplasia, se supone que inicialmente produce una inmunovigilancia [241], es decir, que ante la presencia de antígenos y otras proteínas tumorales el sistema inmune reacciona de forma intensa e intenta destruir estas células aberrantes lo que puede conducir a su completa eliminación. Cuando esto no se produce por inmunidad no competente o porque el tumor adquiere la capacidad de escapar al sistema inmune algunas células malignas sobreviven en un ambiente proinflamatorio. Esto, al menos momentáneamente, conduce a una fase de equilibrio en la que el tumor puede no ser clínicamente evidente. Pero esta estimulación constante del sistema inmune conduce a su

agotamiento y a que se produzca un crecimiento mayor del tumor; en este momento el tumor escapa al control del sistema inmune y puede hacerse detectable [241, 242] (figura 6).

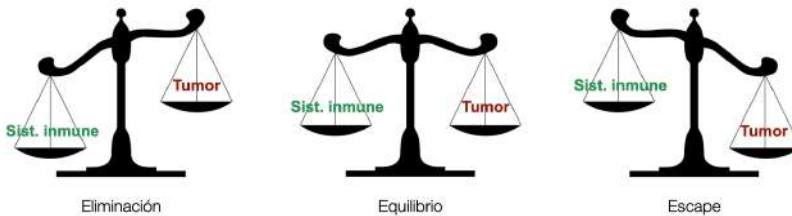


Figura 6. Papel del sistema inmunológico en el desarrollo inicial del cáncer.

También las células senescentes son eliminadas por el sistema inmunológico, pero con la edad, y la pérdida de capacidad del sistema inmune para eliminarlas, van acumulándose [170]. Esto, asociado a las señales paracrinas emitidas por dichas células (el conocido fenotipo secretor asociado a la senescencia), así como la acumulación de daño tisular y el fomento del fenómeno de *inflammaging* promueven el crecimiento de las células tumorales. A su vez, el aumento de las células T reguladoras se ha visto relacionado con el desarrollo del cáncer.

Por tanto, el sistema inmune tiene una función crucial en el desarrollo del cáncer, pero con un doble papel que además es opuesto, ya que participa en la vigilancia y rechazo tumoral, pero también puede inducir un estado proinflamatorio y favorecer así el crecimiento tumoral [190].

De hecho, uno de los determinantes del cáncer es la presencia de inflamación crónica junto con la evasión del sistema inmune [175] (figura 7), lo cual está favorecido por los cambios de la inmunosenescencia. Pero aunque esta interacción se produce a nivel local, no puede desarrollarse sin la comunicación que existe entre el sistema inmune a nivel de sangre periférica, en sus múltiples componentes, con el tumor.



Figura 7. Determinantes del cáncer. Cedido por Vicente Palomar-Abril Adaptado de Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell [Internet]. 2011;144(5):646–74.

Pero es que además, el cáncer es capaz durante su desarrollo de modular el sistema inmune. En primer lugar, se ha descrito ampliamente el aumento de la producción hematopoyética de la línea mieloide, representada por neutrófilos inmaduros y monocitos. Esto además, se relaciona con estadios más avanzados y con una peor evolución, materializado en biomarcadores reconocidos como factores pronósticos como es la ratio entre neutrófilos y linfocitos

(*neutrophil to lymphocyte ratio* o NLR) [243–245]. Pero no sólo esto, sino que la eliminación del tumor (por ejemplo, tras una cirugía), puede reestablecer las características del sistema inmune. Esto implica que el tumor supone un estrés antigénico que queda reflejado a nivel sistémico, pero dadas las características dinámicas del sistema inmunológico, es posible su modulación en función de la situación de la enfermedad oncológica [246]. El restablecimiento del sistema inmune se debe a que cesa el estímulo antigénico, pero en algunos casos, el estado supresor que se activa para promover la cicatrización, podría promover la metastatización y persistencia de células tumorales en algunos individuos. Sería interesante determinar qué factores van a hacer predominar un escenario u otro (como el subtipo tumoral, estadios más avanzados...).

En sentido inverso, tiene sentido que la progresión tumoral, induzca cambios sugestivos de inmunosenescencia incluso en individuos de edad menos avanzada. Esto se ha observado por ejemplo, en pacientes oncológicos, que muestran un aumento de DC con perfil proinflamatorio (CD14⁺ CD16⁺) pero disfuncionales, así como un aumento de las células T reguladoras [239], y así, ambos contribuyen a la ausencia de activación de las células T efectoras y por tanto, a un ambiente inmunosupresor que facilite la progresión tumoral. También disminuye el repertorio del TCR de las células *naïve*, aumentan los linfocitos B reguladores y disminuye la capacidad citotóxica de los linfocitos NK [247]. Muchos de estos factores se han relacionado con sólo con la progresión tumoral, sino también con la respuesta a tratamientos con inmunoterapia (del mismo modo

que los niveles altos de IL-6 se han correlacionado con una peor evolución en tratamiento con inmunoterapia).

Todos estos hechos habían sido descritos previamente como marcadores de inmunosenescencia, pero se encuentran en pacientes diagnosticados de diferentes subtipos tumorales, de forma independiente a la edad; aunque hay datos que sugieren que estos cambios pueden ser todavía más marcados en pacientes añosos con cáncer [248].

Aunque el envejecimiento se ha relacionado claramente con el desarrollo del cáncer, y en la práctica clínica habitual vemos cada vez un mayor número de pacientes añosos, la inclusión en ensayos clínicos relacionados con cáncer sigue siendo pobre, con <10% de pacientes incluidos con edad igual o superior a 75 años [239]. Por esto, y por las particularidades del paciente anciano con cáncer, es de gran relevancia el estudio de esta población tan heterogénea, considerándola de forma holística. Sobre todo, con la eclosión de fármacos para el tratamiento del cáncer cuyo mecanismo de acción es la modulación del sistema inmunológico.

1.6. Impacto del sistema inmune en el cáncer de pulmón

La inmunoterapia ha supuesto un nuevo paradigma de tratamiento en algunos tumores, de entre los que destaca el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). Con estos tratamientos (principalmente moléculas anti-CTLA4, anti-PD-1 y

anti-PD-L1) se pretende modular el sistema inmune del paciente, para que éste sea el que consiga destruir las células tumorales. No obstante, es llamativo que no todos los pacientes presentan respuestas a estos tratamientos, mientras que en otros, induce respuestas profundas y mantenidas en el tiempo. Para predecir las respuestas, los estudios hasta el momento se han centrado predominantemente en el estudio del microambiente tumoral, y se han postulado como biomarcadores de respuesta la expresión de PD-L1 y de la carga mutacional tumoral (o *tumoral mutational burden, TMB*). Sin embargo, estos biomarcadores son imperfectos, y no consiguen determinar con precisión qué pacientes responderán (o no) a dichos tratamientos. Por eso, más recientemente, se ha hecho hincapié en el conocimiento de las interrelaciones entre el sistema inmune y el cáncer de pulmón.

El microambiente tumoral del cáncer de pulmón es rico en células inmunes, y su población mayoritaria son los linfocitos T, aunque la composición inmunológica es muy variada [249]. La presencia de linfocitos T se ha relacionado con un mejor pronóstico, aunque como hemos visto, la funcionalidad de los distintos subtipos celulares es muy distinta. De hecho, se sugiere que los linfocitos T predominantes en el microambiente tumoral del cáncer de pulmón son CD8⁺ TEMRA. Asimismo, la infiltración por estas células, con reducida actividad citolítica, se ha visto correlacionada con la edad del individuo [250], lo cual corresponde con los cambios observados con la edad en las células en sangre periférica en individuos sanos. De modo similar, se ha objetivado un aumento de los linfocitos T

reguladores en el microambiente tumoral, sobre todo en los individuos añosos.

Aunque las células cancerosas tienen capacidad de producir cambios en el microambiente tumoral para conseguir la inmunotolerancia [251] y por tanto, su supervivencia, la evidencia científica reciente indica que la situación inmunológica basal del individuo juega también un papel en la composición de células inmunes en el tumor.

Además de eso, la vía de metastatización en cáncer de pulmón es hematológica, lo que implica que micro-émbolos tumorales tendrán que circular por los vasos sanguíneos y escapar al sistema inmune para conseguir llegar y proliferar en otra localización del organismo. No obstante, queda por estudiar de forma exhaustiva el sistema inmunológico en sangre periférica de los pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón.

1.7. Justificación del estudio

Actualmente, existe abundante evidencia de que el sistema inmune del ser humano se modifica con la edad, y estos cambios se han denominado inmunosenescencia. Aunque el paso de los años constituye uno de los elementos clave en este suceso, múltiples factores ambientales (como la exposición antigénica o el estilo de vida) pueden modular dicha transformación. Estos cambios parecen constituir una solución adaptativa del individuo, no obstante, se han relacionado también con múltiples patologías, de entre las cuales destaca el cáncer.

De hecho, dos de los determinantes para la generación y metastatización del cáncer están relacionados directamente con el sistema inmunológico, como son, la inflamación y la evasión del sistema inmune. Además, se ha demostrado también que el tumor es capaz de alterar la composición de las células inmunes que conforman el microambiente tumoral e incluso tener un impacto a nivel sistémico.

En este sentido, una reciente revisión de la revista *Nature* enfatiza la importancia de la investigación de los elementos del sistema inmune en sangre periférica en los pacientes con cáncer [247], debido a los múltiples cambios que se producen a este nivel durante el desarrollo y la progresión tumoral, así como por el relevante papel del sistema inmune en el control de la enfermedad tumoral, sobre todo con la implantación del uso de inmunoterapia. Y fundamentalmente, en el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), ya que es una enfermedad de alta prevalencia, y en la cual el uso de estos fármacos se ha ido extendiendo desde la enfermedad avanzada, hasta los estadios localmente avanzados y localizados.

Además, esto tiene especial relevancia en el paciente anciano, cuyo sistema inmune basal será más propenso a tener una menor proporción de células inmaduras con capacidad de reconocer neoantígenos, mayor proporción de células exhaustas, y un mayor grado de inflamación crónica basal (denominado *inflammaging*). No obstante, esto no puede generalizarse, ya que, los individuos ancianos con cáncer constituyen una población altamente heterogénea, y dado los múltiples factores que pueden influir tanto en el desarrollo de la

inmunosenescencia, como en el envejecimiento, y en la evolución de la enfermedad neoplásica, es de gran interés conocer la situación funcional, cognitiva, nutricional y emocional de los pacientes con CPNM y cómo esto puede impactar en su sistema inmunológico más allá de la edad cronológica.

Con el objetivo de contribuir a un mayor entendimiento del sistema inmune en el paciente con cáncer de pulmón no microcítico, y sobre todo, de los factores clínicos, individuales y ambientales que pueden modular los cambios de la inmunosenescencia, se ha diseñado este estudio prospectivo y transversal en el que se han incluido los pacientes diagnosticados de CPNM en el Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia entre marzo de 2018 y febrero de 2021.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

*No hi ha barrera, pany ni forrellat
que pugues imposar a la llibertat de la meua ment.*

Virginia Woolf

2. Hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis

Dado el conocimiento existente de que el envejecimiento asocia diversos cambios fisiológicos que pueden influir en la evolución de los pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña y, ante el auge de las terapias inmunológicas, surge la necesidad de conocer los cambios que se producen en el sistema inmune de estos pacientes con la edad.

Además, interesa conocer la relación de dichas alteraciones con otros parámetros clínicos que pueden estar alterados con la edad (nutricionales, funcionales y cognitivos, entre otros) y con la extensión de la enfermedad al diagnóstico.

La hipótesis de este estudio es que existen diferencias significativas en los parámetros del sistema inmunológico en los pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón no microcítico que van más allá de la edad cronológica; es decir, que no sólo la edad influye en el desarrollo de la inmunosenescencia, sino que también tienen un papel factores clínicos, funcionales, nutricionales, patológicos y psicosociales en los pacientes con CPNM.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo primario

Estudiar los principales parámetros analíticos inmunitarios que se han descrito como marcadores de inmunosenescencia en los pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña en el Hospital Universitario Doctor Peset y comprobar si existen alteraciones significativas con la edad.

2.2.2. Objetivos secundarios

1) Examinar la posible relación entre los principales marcadores de inmunosenescencia y de *inflammaging* y factores clínicos, sociodemográficos y del tumor.

2) Valorar si existe correlación de otras poblaciones celulares con variables clínicas y analíticas (c. dendríticas, linfocitos γδ).

3) Analizar si el estado nutricional tiene influencia sobre los cambios que se producen en el sistema inmune. Esto se hará a través del IMC y parámetros analíticos (albúmina, colesterol entre otros).

4) Estudiar si factores funcionales, cognitivos, sociales y psicológicos hacen más evidentes los parámetros de inmunosenescencia en los pacientes ancianos, a través de la valoración geriátrica integral.

5) Investigar si en los pacientes jóvenes el estado funcional o factores psicológicos como la ansiedad-depresión, podrían producir alteraciones en el sistema inmunitario.

6) Determinar si la infección por CMV tiene influencia en los cambios que se producen en el sistema inmune.

7) Explorar si pueden definirse grupos de pacientes en función de su situación inmunológica, que se correlacionen con características clínicas del paciente, del tumor o bien otros factores analíticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

*Segueix el teu cor
però emporta't amb tu el cervell.*

Alfred Adler

3. Material y métodos

3.1. *Ámbito del estudio*

Nuestro estudio se enmarca en la población asignada al Departamento de Salud de Valencia – Doctor Peset para la asistencia sanitaria, que comprende un total de 279.334 habitantes [252] (datos de marzo de 2021). Esta población, muestra la distribución por edades y sexo que se muestra a continuación:

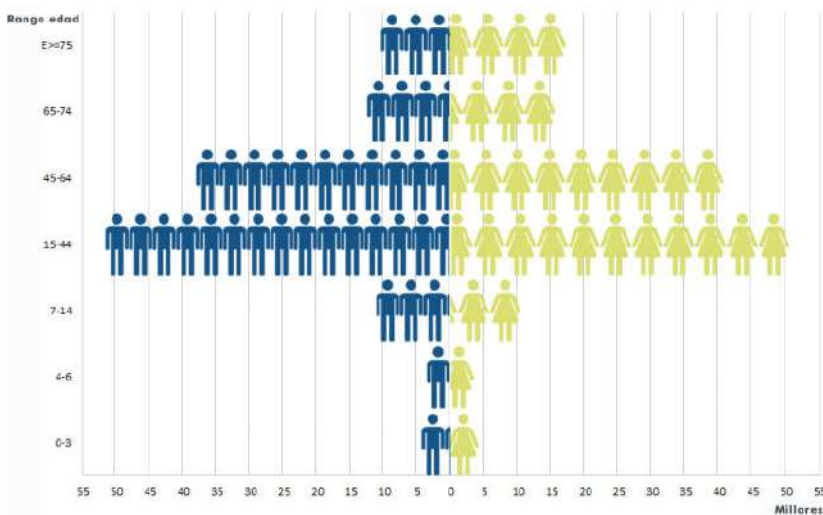


Figura 8. Pirámide de población (mostrando sexos y rango de edad) correspondiente al Departamento de Salud de Valencia Doctor Peset. Extraída de la web del departamento [252].

3.2. Población del estudio

De entre los pacientes atendidos en el departamento, la población objetivo, fue aquella constituida por los pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) en cualquier estadio de la enfermedad.

Para evitar sesgos de selección, se reclutó sistemáticamente y de forma consecutiva a todos los pacientes diagnosticados de CPNM que fueron atendidos por primera vez en el servicio de oncología médica y que cumplían los criterios de inclusión y no presentaban ningún criterio de exclusión (éstos se detallan a continuación).

3.2.1. Criterios de inclusión

- ▶ Pacientes mayores de 18 años diagnosticados de cáncer de pulmón no microcítico en el Hospital Universitario Doctor Peset desde marzo de 2018 hasta completar el tamaño muestral requerido para el análisis.
- ▶ Los pacientes debían ser informados del objetivo del estudio y firmar el consentimiento informado del mismo (ver en sección 10. Anexos).
- ▶ Debía realizarse una anamnesis completa que incluyese los datos clínicos y demográficos necesarios para el estudio.
- ▶ Pacientes que accediesen a la extracción analítica incluyendo un tubo analítico extra para el análisis de poblaciones linfocitarias.

3.2.2. Criterios de exclusión

- ▷ Pacientes en los que no pudiera realizarse una anamnesis y una valoración integral completa.
- ▷ Pacientes cuyos datos analíticos no pudieran ser obtenidos.
- ▷ Pacientes con factores que pudieran influir de forma significativa en el sistema inmune y actuar como factores de confusión (diagnosticados de otras infecciones crónicas como virus de inmunodeficiencia humana o diagnosticados de enfermedades autoinmunes). También pacientes con tratamiento inmunosupresor, incluyendo corticoides a dosis igual o mayor de 10 mg de prednisona/día durante al menos 1 semana.
- ▷ Pacientes que no firmasen el consentimiento informado o bien que revoquen el mismo.
- ▷ Pacientes que hubieran iniciado tratamiento oncológico activo.

3.2.3. Tamaño de la muestra

Inicialmente, se realizó el cálculo del tamaño muestral tomando como referencia estudios de inmunosenescencia realizados en población general (ya que cuando se diseñó el proyecto de investigación no existían datos en población con cáncer). Dado que se ha demostrado que el principal factor en la inmunosenescencia en la población general es la edad, se ha categorizado a los pacientes en dos grupos en función de esta

variable. El punto de corte entre ambos grupos se situó en los 70 años puesto que la mayoría de estudios de valoración geriátrica utilizan este mismo punto de corte. Esto es porque se considera que los cambios fisiológicos que se producen con la edad se manifiestan con más frecuencia a partir de los 70 años y este punto de corte se ha utilizado de forma consistente en oncogeriatría [253–255].

Según la bibliografía revisada, y considerando como variable principal los linfocitos $CD8^+CD57^+CD27^-$ sería esperable detectar diferencias de un 10% entre los pacientes jóvenes y ancianos. Teniendo en cuenta la distribución por edades del cáncer de pulmón en la bibliografía y en series previas en nuestro departamento, se realizó el cálculo con una distribución de 40% de pacientes ancianos (≥ 70 años) y 60% jóvenes (< 70 años). El tamaño muestral necesario para este estudio se estimó en $n = 182$ pacientes (73 pacientes ancianos y 109 jóvenes) calculado para obtener una probabilidad del 95% de detectar una diferencia de 0,5 desviaciones típicas (según un muestreo exploratorio inicial) mediante un test t unilaterial para dos grupos independientes, asumiendo un nivel de significación $\alpha = 0.05$ y un ratio 60:40 de jóvenes vs ancianos en la población objeto de estudio (lo cual se correspondía con una estimación obtenida a partir de un muestreo exploratorio inicial). Este cálculo se realizó mediante el paquete G*Power, versión 3.1 [256], de acuerdo con el procedimiento clásico recogido por Cohen (1969).

No obstante, y dado que no teníamos evidencia de que los datos observados en población general fueran superponibles a

la población oncológica se realizó un análisis exploratorio con 98 pacientes, y hallamos que existía una probabilidad muy baja de encontrar diferencias superiores al 10% en la variable principal (linfocitos CD3⁺ CD57⁺ CD27⁺) estadísticamente significativas entre la población de pacientes jóvenes vs. ancianos diagnosticados de CPNM.

Por tanto, concluimos que el tamaño muestral calculado inicialmente, basado en características de población sin cáncer, no era extrapolable a nuestra muestra. Sin embargo, debido a las dificultades encontradas en la inclusión de nuevos pacientes por la pandemia ocasionada por el virus Sars-CoV-2 nos vimos obligados a detener el reclutamiento del estudio en febrero 2021.

En primer lugar, durante los meses de mayor incidencia de infecciones por Sars-CoV-2, y por tanto, más ingresos por este motivo, los medios hospitalarios tanto técnicos como de recursos humanos estaban dedicados en mucha menor medida a la labor de investigación por las necesidades asistenciales. Además, muchos pacientes se diagnosticaron en situación más avanzada, otros, padecieron la infección por Sars-CoV-2 y se desconoce los cambios que esta infección puede producir a largo plazo en el sistema inmunológico. Por tanto, un mayor porcentaje de pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón no microcítico durante estos últimos 12 meses, no cumplieron los criterios de inclusión/exclusión y por tanto no pudieron ser reclutados.

3.2.4. Población final del estudio

Desde marzo de 2018 hasta febrero de 2021 fueron valorados en oncología médica un total de 271 pacientes con diagnóstico de CPNM de todos los estadios. No obstante, la población final candidata a estudio fue de 131 pacientes debido a factores clínicos (un porcentaje importante de pacientes estaban recibiendo tratamiento con corticoides a dosis elevadas al diagnóstico del cáncer de pulmón o presentaban infecciones crónicas o enfermedades autoinmunes) y problemas técnicos (nos encontramos con problemas de *stock* de los tubos de análisis principalmente durante los meses de verano de 2018 y 2019, y sobre todo, una imposibilidad para compaginar la actividad investigadora con la asistencial durante los meses con mayor incidencia de infecciones por Sars-CoV-2). El diagrama con los motivos específicos para la exclusión de pacientes se muestra a continuación (figura 9).

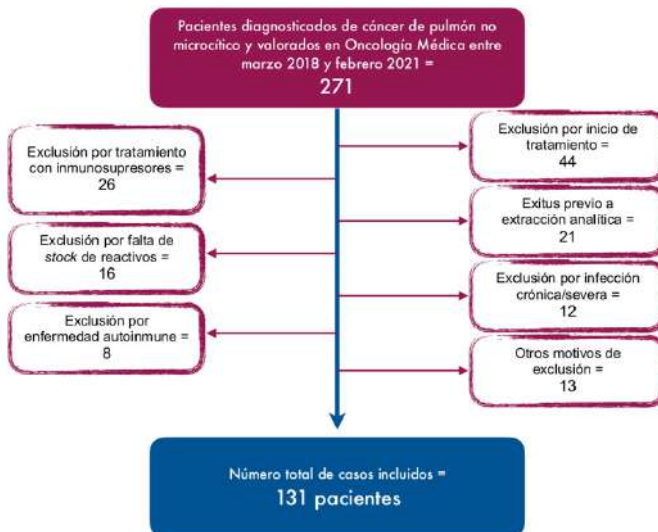


Figura 9.
Diagrama de flujo de pacientes del estudio.

3.3. Diseño del estudio

Se trata de un estudio analítico, observacional y transversal de datos prospectivos, incluyendo a los pacientes valorados en oncología médica del Departamento de Valencia Dr Peset desde marzo de 2018 a febrero 2021.

En la primera visita en oncología se realizaba una anamnesis completa, incluyendo la valoración geriátrica en los pacientes ancianos, y el test de ansiedad-depresión y valoración social y nutricional en los pacientes jóvenes, como parte del protocolo asistencial del servicio. También en esa visita con el especialista se informaba de las características del estudio y se entregaba la hoja de información y consentimiento informado a los pacientes para su consulta. Los pacientes eran citados para extracción analítica en hospital de día del centro, siguiendo la práctica clínica habitual. Los pacientes que accedían a participar en el estudio aportaban el consentimiento informado firmado y, aprovechando la venopunción descrita, se extraía un tubo más para el análisis de las poblaciones linfocitarias.

La información de la anamnesis así como los resultados analíticos (salvo los obtenidos mediante citometría de flujo) se recopilaban en el programa OrionClinic®, ya que es el *software* empleado para el almacenamiento de la historia clínica electrónica en el Departamento de Salud Dr Peset. En cambio, los datos de citometría de flujo se recogían en el *software* Kaluza® para su análisis.

3.4. Variables del estudio

La variable principal del estudio es el valor absoluto de linfocitos CD8⁺ maduros, definida como la población CD57⁺CD27⁻ (que engloba linfocitos CD57⁺CD27⁻CD28⁺ y CD57⁺CD27⁻CD28⁻), ya que son unas de las principales células definitorias de los procesos de inmunosenescencia, por su aumento progresivo con la edad en población sana [215]. Las variables restantes se describen a continuación.

3.4.1. Variables demográficas

- ▶ Número de paciente: cada paciente llevaba asignado un número propio del estudio, para su fácil identificación, pero que permitía la anonimidad de los mismos, cumpliendo así con las garantías que establece la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de carácter personal, y del Real Decreto 1720/2007. Posteriormente se publicó la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales y a al Reglamento (UE) 2016/679 de Parlamento europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos; éstas se revisaron para corroborar su cumplimiento.
- ▶ Sexo: se recoge para cada paciente si se trata de una mujer u hombre.
- ▶ Edad al diagnóstico: calculado con la fecha de nacimiento y la fecha exacta de diagnóstico anatomopatológico.

3.4.2. Hábitos tóxicos

- ▶ Hábito tabáquico: se clasifica a los pacientes en 3 grupos en función de si son fumadores actualmente, fumadores en el pasado o si nunca han consumido tabaco.
- ▶ Exposición tabáquica: recogida en la variable paquetes / año, mediante la fórmula: número de cigarrillos consumidos al día multiplicados por los años de consumo de tabaco y dividido entre 20.

3.4.3. Características clínicas de los pacientes

Se recopilan en primer lugar comorbilidades cuya incidencia aumenta con el envejecimiento:

- ▶ Diabetes mellitus: considerada variable binaria (sí o no).
- ▶ Cardiopatía: insuficiencia cardiaca o cardiopatía isquémica. También binaria (sí o no).
- ▶ Enfermedad neurodegenerativa: considerando la presencia o ausencia de dichas enfermedades (sí o no), principalmente demencia tipo Alzheimer, pero también otros tipos de deterioro cognitivo.

También variables clínicas relacionadas con el estado nutricional:

- ▶ IMC: calculado mediante la fórmula peso/altura².
- ▶ Porcentaje de pérdida de peso, determinado en los últimos 6 meses.

- ▷ Situación nutricional: definida según el consenso de *Fearon et al* [257] en: situación normal (sin pérdida de peso o <2%); posible precaquexia (pérdida del 2-5% de peso en 6 meses con IMC ≥ 20 kg/m²); y posible caquexia (pérdida de >5% de peso en los últimos 6 meses o de >2% con IMC <20).

3.4.3.1. Variables de la situación funcional (todos los pacientes)

- ▷ Clasificación del estado funcional (*performance status* o *PS*) según la escala ECOG que tiene reconocido impacto pronóstico en cáncer [258]:
 - **ECOG-PS 0**: capaz de realizar todas las actividades previas a la enfermedad. Completamente activo/a.
 - **ECOG-PS 1**: capaz de caminar y realizar trabajos ligeros (ej. tareas ligeras en casa, trabajo de oficina...). Pero algún síntoma produce restricción en actividad física extrema.
 - **ECOG-PS 2**: capaz de caminar y del cuidado personal, pero incapaz de realizar cualquier tipo de trabajo. Necesita estar en la cama o sentado/a menos del 50% del tiempo de las horas que está despierto/a.
 - **ECOG-PS 3**: limitación para el cuidado personal. Necesita estar en la cama o sentado/a más del 50% del tiempo de las horas que está despierto/a.
 - **ECOG-PS 4**: no puede encargarse del autocuidado (ej. comer, asearse, movilizarse en la cama...). Pasa todo el tiempo que estoy despierto/a en la cama o en la silla.

- **ECOG-PS 5:** muerto/a.

- ▶ *Mini nutritional assessment (MNA):* cuestionario de con preguntas relacionadas con la situación nutricional. Tiene una posible puntuación 0-14 y se considera anormal si es ≤ 11 puntos.
- ▶ Estado civil: soltero/a, casado/a, separado/a, viudo/a.
- ▶ Nivel de estudios: elemental, bachillerato, estudios universitarios.
- ▶ Composición del hogar: se especifica si el paciente vive solo/a o acompañado/a.
- ▶ Puntuación en la escala de MOSs (*Medical Outcomes Study survey*): se evalúa mediante 5 preguntas (puntuación total 5-25) la percepción del paciente en cuanto a su apoyo social [259]. No hay un claro punto de corte establecido.
- ▶ Puntuación en la escala de ansiedad-depresión: se realizan un total de 14 preguntas, 7 referidas a síntomas de ansiedad y 7 a síntomas de depresión. Se obtiene una puntuación para cada síntoma: no indica caso 0-7 puntos; caso dudoso 8-10 puntos; caso probable ≥ 11 puntos.

3.4.3.2. Variables de la valoración geriátrica integral (pacientes de 70 años o más)

- ▶ Puntuación según *screening* G8: se realizan 8 preguntas relacionadas con la situación nutricional, funcional y comorbilidad, teniendo en cuenta la edad del paciente y se asigna una puntuación de 0-17 (ver en Anexos). Se

establece el punto de corte en 14, y se considera que los pacientes con puntuación de 14 o menor tienen un mayor riesgo de fragilidad y por tanto hay indicación de realizar una valoración geriátrica completa [260].

- ▷ Capacidad auditiva: conservada o no.
- ▷ Escala Barthel: puntuación de 0-100 en función de la capacidad para realizar actividades básicas de la vida diaria (ABVD).
- ▷ Escala Lawton-Brody: puntuación de 0-5 en hombres y 0-8 en mujeres, que evalúa la capacidad para realizar actividades instrumentales de la vida diaria (AIVD). Se considera alterada si hay un déficit en cualquiera de los elementos considerados.
- ▷ Puntuación de *short physical performance battery* (SPPB): se obtiene una puntuación entre 0-12 y se clasifica a los pacientes: 0-3: limitación severa de movilidad; 4-6: limitación moderada; 7-9: limitación leve; ≥ 10 sin limitación para la movilidad.
- ▷ Número de caídas en los últimos 6 meses: variable numérica con este parámetro.
- ▷ Escala Pfeiffer: cuestionario compuesto por 10 preguntas que evalúa la orientación, memoria a corto y a largo plazo, información sobre hechos cotidianos y una operación matemática sencilla pero consecutiva [261]. El punto de corte más empleado para individuos que pueden leer y escribir son 2 puntos; si no pueden leer o escribir, se considera que los pacientes tienen deterioro cognitivo con 3 puntos o más. Se trata de un test de cribado.

- ▷ Puntuación en el test mini-mental de Lobo [262]: evalúa también la función cognitiva en distintas dimensiones, orientación, capacidad de fijación, cálculo, memoria, lenguaje y praxis constructiva. La puntuación puede ser de 0 a 35. El punto de corte depende del nivel de estudios del individuo y se considera alterado en pacientes con baja escolaridad o que no son capaces de leer o escribir si la puntuación es <20 . En individuos con escolarización, el punto de corte es 23.
- ▷ Escala de situación socio-familiar de Gijón: permite valorar la situación socio-familiar mediante 4 preguntas con una puntuación total entre 5 y 20. Se considera que los pacientes con ≤ 7 puntos tienen una buena situación social y bajo riesgo de institucionalización; ≥ 10 puntos un deterioro social severo (y por tanto, alto riesgo de institucionalización); entre 8-9 la valoración es de situación intermedia [263].
- ▷ Escala de Yesavage (versión reducida a 15 ítems): se realizan 25 preguntas (con respuesta sí/no) y se asigna una puntuación 0/1 a cada una de ellas. Puede realizarse mediante auto-evaluación. Si la puntuación es de 0-5 se considera que no hay síntomas depresivos; 6-9 indicaría una posible depresión leve; por último ≥ 10 puntos indican depresión establecida.
- ▷ Puntuación en la escala de Charlson [264]: empleado para la evaluación de comorbilidad. Aunque tiene un número limitado de enfermedades en consideración, incluye aquellas que han demostrado un impacto relevante en

supervivencia (como infarto de miocardio, diabetes mellitus, entre otras) y predice la tasa de supervivencia a los 10 años.

- ▶ *Cumulative illness rating scale for geriatrics* o escala acumulativa de tasa de enfermedad (CIRS-G): se trata de una herramienta para la evaluación de comorbilidades, mediante la asignación (o no) de la enfermedad que padezca el paciente para cada uno de los grandes órganos y posteriormente la asignación de una puntuación a cada una de ellas en función de su gravedad. Puede evaluarse la puntuación total y también el índice de severidad (puntuación total / número de órganos o sistemas afectados) [265]. No existe un punto de corte validado.
- ▶ Polifarmacia: se recopilan el número de fármacos que toma el paciente de forma habitual.
- ▶ Síndromes geriátricos: se consideran síndromes geriátricos el diagnóstico de demencia, *delirium*, depresión, caídas o incontinencia. Se identifica si existe o no algún síndrome geriátrico, y en otra variables se especifica cuál.
- ▶ Clasificación geriátrica: existen distintos métodos de agrupación de los pacientes ancianos, cuya finalidad es determinar si podemos considerarlos *fit*, vulnerables o frágiles. En nuestro caso, se han empleado las de Balducci y SIOG1 [266].
 - **Balducci**: clasifica a los pacientes como *fit* a los pacientes ≤ 85 años, sin enfermedades G3-4 ni síndromes geriátricos, sin dependencia para ABVD y que

requieran ayuda como máximo para una actividad instrumental; vulnerables si presentan una o dos patologías G3-4 (el resto de características son comunes a los pacientes *fit*); y frágiles si son >85 años, tienen al menos 3 comorbilidades G3-4, requieren ayuda para más de una actividad instrumental o bien han sido diagnosticados de cualquier síndrome geriátrico.

- **SIQG1:** clasifica a los pacientes como *fit* si no presentan ninguna comorbilidad G3-4 y son independientes para las ABVD y todas las instrumentales; vulnerables si presentan alguna patología G3 (pero no G4), requieren ayuda para una actividad instrumental (pero no para ABVD) o bien si tienen criterios de riesgo para malnutrición; frágiles si padecen alguna comorbilidad G4, dos o más G3, dependencia para ABVD o diagnóstico de desnutrición; y por último, muy enfermos si presentan 2 o más comorbilidades G4 o bien PS-ECOG = 4.

Para la evaluación de las diferentes áreas, se han empleado los test definidos en el consenso *Delphi* de oncogeriatría en España publicado en 2018 [267]. Los cuestionarios completos pueden consultarse en la sección 10. Anexos.

3.4.4. Características del tumor

- ▷ Histología del tumor: adenocarcinoma, carcinoma escamoso u otras histologías.
- ▷ T: tamaño tumoral según la clasificación TNM 8ª edición.

- ▷ N: afectación ganglionar según la clasificación TNM 8ª edición.
- ▷ M: afectación metastásica según la clasificación TNM 8ª edición.
- ▷ Estadio tumoral según la clasificación TNM 8ª edición, en estadio IA1-3, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC, IVA y IVB [268].
- ▷ Expresión de PD-L1: expresado en porcentaje (%).
- ▷ En el caso de los adenocarcinomas de pulmón se recogía además su estado mutacional: mutación en EGFR, ALK, ROS1, o en ninguno de estos genes.
- ▷ Tipo de mutación de EGFR (en el caso de que ésta exista). Se recogen las dos más frecuentes: la delección del exón 19, o mutación en el exón 21, u otras.

3.4.5. Variables analíticas bioquímicas

3.4.5.1. Variables nutricionales

- ▷ Colesterol total: expresado en mg/dl.
- ▷ Colesterol HDL: expresado en mg/dl.
- ▷ Colesterol LDL: expresado en mg/dl.
- ▷ Proteínas totales: expresado en mg/dl.
- ▷ Albúmina: expresado en g/dl.

3.4.5.2. Variables inflamatorias

- ▷ PCR: expresado en mg/dl.
- ▷ IL-6: expresado en pg/ml.

3.4.6. Variables analíticas hematológicas

3.4.6.1. Parámetros básicos del hemograma

- ▷ Hemoglobina: expresado en g/dl.
- ▷ Recuento absoluto de leucocitos (células/ μ l) y porcentaje.
- ▷ Recuento absoluto de neutrófilos (células/ μ l) y porcentaje.
- ▷ Recuento absoluto de linfocitos (células/ μ l) y porcentaje.
- ▷ Recuento absoluto de plaquetas (células/ μ l) y porcentaje.

3.4.6.2. Poblaciones linfocitarias básicas

- ▷ Linfocitos CD3⁺ (linfocitos T totales): recuento absoluto (células/ μ l) y recuento relativo (%).
- ▷ Linfocitos CD3⁺CD4⁺ (linfocitos T con expresión de CD4): recuento absoluto (células/ μ l) y porcentaje (%).
- ▷ Linfocitos CD3⁺CD8⁺ (linfocitos T con expresión de CD4): recuento absoluto (células/ μ l) y porcentaje (%).
- ▷ Ratio de linfocitos CD4⁺/CD8⁺.
- ▷ Linfocitos CD19⁺ (linfocitos B totales): recuento absoluto (células/ μ l) y valor relativo (%).
- ▷ Linfocitos NK: recuento absoluto (células/ μ l) y relativo (%).

3.4.7. Variables analíticas hematológicas específicas

3.4.7.1. Subpoblaciones de linfocitos T $\alpha\beta$

- ▷ Linfocitos T maduros: CD3⁺CD27⁻CD57⁺. Recuento absoluto (células/ μ l) y recuento relativo (%).

- ▷ Linfocitos T CD8 maduros: CD3⁺CD8⁺CD27⁻CD57⁺. Recuento relativo (%) (el recuento absoluto es la variable principal).
- ▷ Linfocitos T CD4 maduros: CD3⁺CD4⁺CD27⁻CD57⁺. Recuento absoluto (células/ μ l) y recuento relativo (%).
- ▷ Linfocitos CD8⁺ inmaduros o *naïve* (N): con expresión de CCR7⁺CD27⁺CD28⁺CD45RA⁺. Recuento absoluto (células/ μ l) y recuento relativo (%).
- ▷ Linfocitos CD8⁺ centrales de memoria (CM): con expresión de CCR7⁺CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻. Recuento absoluto (células/ μ l) y recuento relativo (%).
- ▷ Linfocitos CD8⁺ efectores de memoria (EM): con expresión de CCR7⁻CD27[±]CD28[±]CD45RA⁻. Recuento absoluto (células/ μ l) y recuento relativo (%).
- ▷ Linfocitos CD8⁺ con diferenciación terminal y reexpresión de CD45RA (TEMRA): CCR7⁻CD27⁻CD28⁻CD45RA⁺. Recuento absoluto (células/ μ l) y recuento relativo (%).
- ▷ Linfocitos CD4⁺ inmaduros o *naïve* (N): con expresión de CCR7⁺CD27⁺CD28⁺CD45RA⁺. Recuento absoluto (células/ μ l) y recuento relativo (%).
- ▷ Linfocitos CD4⁺ centrales de memoria (CM): con expresión de CCR7⁺CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻. Recuento absoluto (células/ μ l) y recuento relativo (%).
- ▷ Linfocitos CD4⁺ efectores de memoria (EM): con expresión de CCR7⁻CD27[±]CD28[±]CD45RA⁻. Recuento absoluto (células/ μ l) y recuento relativo (%).

- ▷ Linfocitos CD4⁺ con diferenciación terminal y reexpresión de CD45RA (TEMRA): CCR7⁻CD27⁻CD28⁻CD45RA⁺. Recuento absoluto (células/ μ l) y recuento relativo (%).
- ▷ Linfocitos T efectores terminales CD8⁺, con expresión de CD57⁺PD1⁻. (PD1, también denominado CD279). Recuento absoluto (células/ μ l) y recuento relativo (%).
- ▷ Linfocitos T CD8⁺ exhaustos: caracterizados por el patrón de expresión CD57^{+/}PD1⁺. Recuento absoluto (células/ μ l) y relativo (%).
- ▷ Linfocitos T CD8⁺CD4⁺: se analiza el recuento (células/ μ l) y porcentaje (%).
- ▷ Linfocitos T CD8⁻CD4⁻: se analiza el recuento (células/ μ l) y porcentaje (%).
- ▷ Linfocitos T CD4⁺reguladores: se han determinado mediante dos poblaciones, por un lado linfocitos CD4⁺CD25⁺, linfocitos CD4⁺CD25⁺CD127^{low}. Por otro, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. También se recoge el recuento (células/ μ l) y porcentaje (%).

3.4.7.2. Subpoblaciones de linfocitos T $\gamma\delta$

- ▷ Linfocitos T $\alpha\beta$ totales: recuento absoluto(células/ μ l) y porcentaje (%).
- ▷ Linfocitos T $\gamma\delta$ totales: recuento absoluto (células/ μ l) y porcentaje (%).
- ▷ Linfocitos T $\gamma\delta$ VD1⁺: recuento absoluto (células/ μ l) y porcentaje (%).

- ▷ Linfocitos T $\gamma\delta$ VD1⁺ VD2⁺: recuento absoluto (células/ μ l) y porcentaje (%).
- ▷ Linfocitos T $\gamma\delta$ VD1⁻ VD2⁻: recuento absoluto (células/ μ l) y porcentaje (%).
- ▷ Linfocitos T $\gamma\delta$ VD2⁺: recuento absoluto (células/ μ l) y porcentaje (%).

3.4.7.3. Clasificación de células dendríticas

- ▷ Células dendríticas: es decir, células con expresión de HLA-DR y linaje negativo. Valoración de recuento absoluto (células/ μ l) y recuento relativo (%).
- ▷ Células dendríticas plasmocitoides: recuento absoluto (células/ μ l) y porcentaje (%).
- ▷ Células dendríticas mieloides: recuento absoluto (células/ μ l) y porcentaje (%). Dentro de éstas se han descrito tres subtipos que se detallan a continuación.
- ▷ Células dendríticas mieloides cDC4: expresan CD16 y se valora el recuento absoluto (células/ μ l) y porcentaje (%).
- ▷ Células dendríticas mieloides cDC2: expresan CD1c y se valora el recuento absoluto (células/ μ l) y relativo (%).
- ▷ Células dendríticas mieloides cDC1 o convencionales: expresan Clec9A y se valora el recuento absoluto (células/ μ l) y porcentaje (%).

3.4.8. Variables serológicas

- ▷ Presencia o no de anticuerpos IgM contra CMV: recogido como positivo o negativo.
- ▷ Presencia o no de anticuerpos IgG contra CMV: recogido como positivo o negativo.

3.5. Análisis mediante citometría de flujo

3.5.1. Obtención de las muestras

Las muestras analíticas se obtuvieron mediante venopunción, aprovechando la extracción analítica que se realiza en la práctica clínica habitual. Dicha muestra se remitió para bioquímica, hematimetría, y microbiología (serología de virus hepatotropos). Se realizó la extracción de otro tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante para realizar el estudio posterior mediante citometría de flujo de las poblaciones linfocitarias y de células dendríticas. Este análisis se ha desarrollado íntegramente en el servicio de Hematología del Hospital Universitario Doctor Peset.

3.5.2. Flujo de trabajo

En la primera visita de Oncología médica se realizaba la anamnesis completa y se programaba la extracción analítica en el medio hospitalario.

La extracción se ha realizado en todos los casos entre las 8 y las 11 am para evitar variaciones en ritmos circadianos que pudiesen afectar a las determinaciones analíticas. Además, los tubos de analítica se obtuvieron en el servicio de oncología médica, se etiquetaron y fueron trasladados personalmente a las técnicas del laboratorio de citometría para garantizar la trazabilidad de las muestras.

A su vez, se procesaron antes de que transcurrieran 30 minutos desde su extracción en la sección de citometría y citomorfología del servicio de hematología del Hospital Universitario Doctor Peset.

3.5.3. Procesado de las muestras para citometría de flujo

Para realizar el análisis se emplearon los siguientes tubos con una mezcla de anticuerpos marcados con moléculas que emiten fluorescencia, y que permiten definir los diferentes subtipos celulares:

- ▷ *DuraClone IM T cell subsets Tube®*: CD57, CD45, CD45RA, CCR7, CD28, PD1.
- ▷ *DuraClone IM Dendritic cells Tube®*: HLA-DR, CD45, CD16, CD1c, CD11c.
- ▷ *DuraClone IM TCRs Tube®*: TCRVd2, CD45, TCRgd, TCRab, HLA-DR, TCRVd1.
- ▷ *DuraClone IM Treg Tube®*: CD45, CD45RA, CD25, CD39, FoxP3.

- ▷ Tubo para lisis eritrocitaria: VersaLYse 100t CE.
- ▷ Anticuerpo CD127 (linfocitos T reguladores).

Se eligieron estos materiales porque se trata de paneles de anticuerpos previamente preparados, multiparamétricos, con lo cual se evita tener que pipetear los diferentes anticuerpos y reduce considerablemente la posibilidad de errores o de contaminación de la muestra, y por tanto hace que los resultados puedan ser altamente reproducibles en otros laboratorios. Como veremos a continuación, todo el proceso se iniciaba de forma sencilla, mediante la adición de parte de la muestra de sangre al propio tubo donde se encontraba el preparado deshidratado.

De forma regular se comprobaba el adecuado funcionamiento del citómetro, y se realizaron métodos de compensación según lo indicado por el fabricante.

3.5.3.1. Protocolo en los tubos DuraClone T y TCR

Las muestras de cada paciente se pipetearon e incubaron en los diferentes tubos. Aunque los eritrocitos sufren en este proceso una lisis, ésta no afecta a los leucocitos, por lo que fueron posteriormente analizados por citometría de flujo. A continuación se describe el procedimiento para los tubos de linfocitos T (DuraClone IM T e IM TCR®, que contienen 10 y 9 anticuerpos específicos, respectivamente):

1. Pipetear 100 µl de la muestra de sangre en el tubo con el reactivo deshidratado y mezclar (en agitador *vortex*) a alta velocidad durante 6-8 segundos. Posteriormente incubar

durante 15 minutos entre 20-30° y evitando la exposición lumínica directa.

2. Añadir 2 ml de *VersaLyse*®, mezclar en *vortex* a alta velocidad 1-3 segundos e incubar 15 minutos en las mismas condiciones descritas previamente.
3. Centrifugar el tubo a 200 g (g es la unidad es la aceleración de la gravedad) durante 5 minutos. Se aspira el sobrenadante y se descarta, por lo que se queda para continuar el procesado el sedimento (o *pellet*).
4. Rehidratar el sedimento con 3ml de tampón fosfato salino 1X o *phosphate buffered saline* (PBS) y centrifugar a 200 g durante 5 minutos. De nuevo se aspira el sobrenadante y se descarta y se vuelve a crear una suspensión añadiendo 500 µl de PBS 1X con una solución denominada *IO Test 3 Fixative solution* al 0.8%.

En este paso, la muestra ya está preparada para la adquisición de datos mediante citometría de flujo. Es importante recordar que previo al análisis de cada muestra, se ha realizado un test de compensación o calibración mediante reactivos facilitados con dicho objetivo.

3.5.3.2. Protocolo en los tubos *DuraClone* de células dendríticas

El tubo *DuraClone IM Dendritic cells* contiene 12 anticuerpos. Para el procesado del tubo de células dendríticas se realiza la misma técnica, no obstante, en el paso 1, se requiere un mayor volumen de muestra (200 µl), para asegurar la adquisición suficiente de dichas células.

3.5.3.3. Particularidades del procesado del tubo DuraClone de células T reguladoras

Los linfocitos T reguladores se caracterizan principalmente por la expresión de CD4 y CD25, pero también por la presencia del factor de transcripción FoxP3. Debido a su condición intracelular, el procesamiento de las células para su detección requiere un tratamiento diferencial, ya que las células van a requerir fijación y permeabilización. Éste se expone a continuación:

1. Pipetear 50 µl (pueden usarse hasta 100 µl) de la muestra de sangre y añadir al tubo 1 de DuraClone IM Treg con el reactivo deshidratado y mezclar (en *vortex*) a alta velocidad durante 6-8 segundos. Posteriormente incubar durante 15 minutos entre 20-30° y evitando la exposición lumínica directa.
2. Añadir 3ml de PBS 1X y centrifugar a 500 g durante 5 minutos a 20-30°C.
3. Aspirar el sobrenadante y descartarlo. Mezclar el sedimento celular con el *vortex* a baja velocidad (<10000 revoluciones por minuto). Provocar de nuevo la suspensión añadiendo 50 µl de suero fetal de ternero 100%.
4. Agregar 5 µl del fijador *PerFix® Buffer 1* al tubo y mezclar 6-8 segundos.
5. Incubar este tubo 1 durante 15 minutos a 20-30°C protegiéndolo de la exposición lumínica directa.
6. Añadir 400 µl del permeabilizador *PerFix® Buffer 2* al tubo y mezclar 6-8 segundos.

7. Transferir el contenido del tubo 1 al tubo 2 (*DuraClone IM Treg Tube2*). Emplear el *vortex* 6-8 segundos y después incubar durante 60 minutos en las condiciones físicas descritas anteriormente.
8. Añadir 3 ml de PBS 1X al tubo 2 e incubar durante 5 minutos. Seguidamente, centrifugar a 500 g durante 5 minutos a 20-30°C.
9. Pipetear el sobrenadante y descartarlo. Agitar con *vortex* a baja velocidad durante 6-8 segundos. Generar de nuevo la suspensión del *pellet* con 3 ml del *PerFix® Buffer 3 1X* (éste debe ser previamente diluido, ya que viene preparado a una dilución 10X; para ello mezclar con agua destilada).
10. Por último, centrifugar a 500 g durante 5 minutos a 20-30°C. Aspirar el sobrenadante y descartarlo. Mezclar en *vortex* a baja velocidad 6-8 segundos el sedimento celular y añadir de nuevo 500 µl *PerFix® Buffer 3 1X*. En este momento la muestra puede emplearse para su análisis.

Cabe destacar que en nuestro estudio, en 2019 se realizó el análisis de los primeros pacientes, y se encontró que la población de linfocitos CD4 *helper* era difícilmente identificable con los marcadores intracelulares, ya que la adquisición de estas células era menor a la esperada. Se hizo una investigación más profunda en cuanto a este subtipo celular y las formas de identificación. Como se observa a partir del paso 4 descrito previamente, se estaba empleando el fijador y permeabilizador

PerFix® con el que la determinación de FoxP3 (que es un marcador intracelular) era dificultosa.

Por tanto, tras una búsqueda bibliográfica, se probaron los tampones de tinción FoxP3/Transcription Factor eBioscience™ en 5 muestras y se comprobó que este permeabilizador (Fix&Perm®), que es más específico para FoxP3, detectaba estas células con mayor sensibilidad y por tanto, había una mayor adquisición de células mediante citometría de flujo.

De todos modos, existe otra forma de detección de las células T helper, mediante el marcador de superficie CD127 (con expresión *low*) [269], que ya estábamos empleando (añadiendo 5 µl del preparado de dicho anticuerpo en el paso 1), por lo que el cambio del permeabilizador, nos aportó una nueva forma de detección de este subtipo celular con mayor precisión.

Este hecho, supuso que para analizar los linfocitos T reguladores de la muestra total, nos limitásemos al uso de la población CD4⁺CD25⁺; mientras que el análisis de una población que es algo más representativa de los linfocitos T reguladores (CD4⁺CD25⁺CD127^{low}) sólo se pudo completar en 98 pacientes (de los 131). Y por último, las subpoblaciones de T reguladores, empleando marcadores como FoxP3 sólo está disponible para 47 pacientes (para los que se pudo emplear el segundo permeabilizador), por lo que el análisis de estas poblaciones se realizó por separado.

3.5.4. Análisis de la citometría de flujo

3.5.4.1. Fundamentos de la citometría de flujo

La citometría de flujo se basa en la detección de características ópticas y de fluorescencia de células individuales (o incluso otras partículas), mientras éstas fluyen en una suspensión dentro de un dispositivo de detección. Estas células (en nuestro caso), previamente habían sido marcadas con anticuerpos frente a proteínas de membrana (o intracelulares como FoxP3).

El medio fluido busca que el movimiento de cada célula las separe para cuando lleguen a la zona de detección, y esto se consigue reduciendo el diámetro del conducto por el que circularán dichas células, de modo que, al estar circulando en un flujo laminar, la disminución del diámetro del tubo inducirá un aumento de la velocidad de circulación de dicho fluido y por lo tanto de las células [270].

En la zona de detección, un láser emite luz que al impactar en la célula emitirá fluorescencia con una longitud de onda diferente a través de una serie de filtros de bandas y mecanismos ópticos integrados, que dependerá del anticuerpo presente en cada una de esas células. Para dicha detección, el citómetro de flujo utilizado en nuestro estudio (CytoFLEX™) emplea fotodiodos de avalancha (*avalanche photodiodes*, APD), lo cual permite aumentar la sensibilidad para longitudes de onda >700 nm (además de ser de menor tamaño y más económicos) frente a los clásicos tubo fotomultiplicador (PMT) [271] (figura 10).

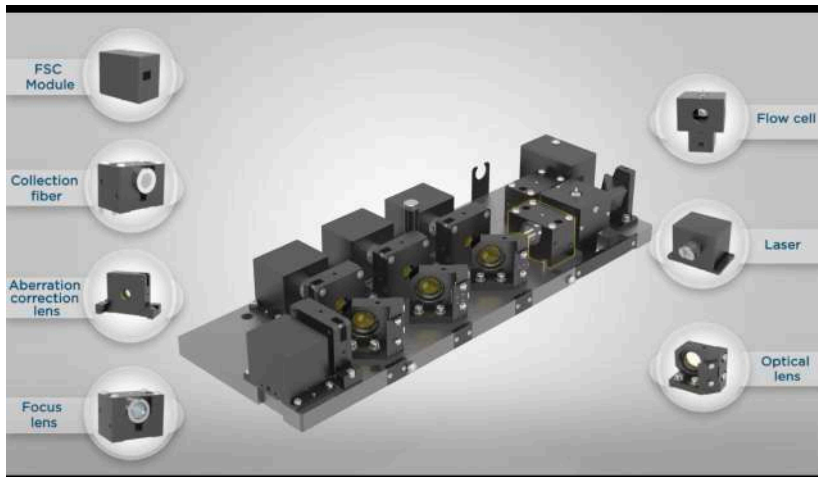
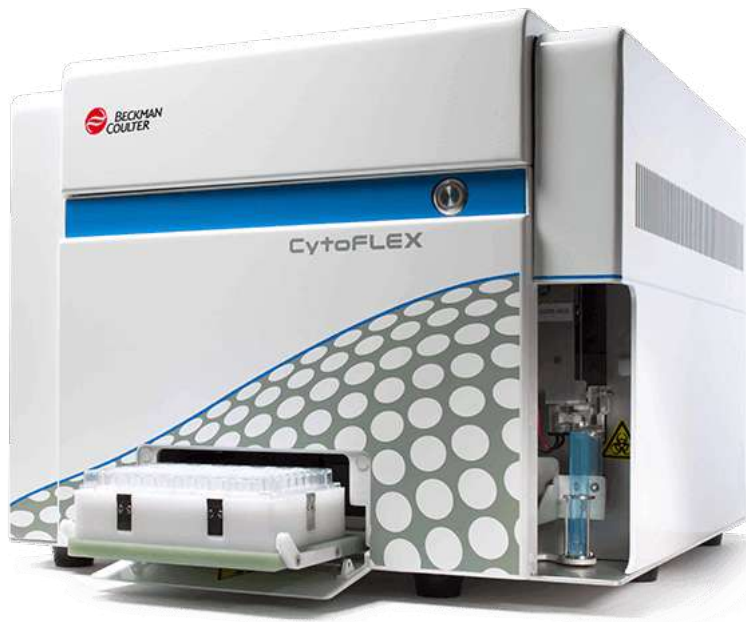


Figura 10. Citómetro de flujo empleado en el proyecto, modelo CytoFLEX de Beckman Coulter® (imagen extraída de la página web de Beckman Coulter) [272]. Aspecto externo (arriba) y componentes principales (abajo).

Por tanto, los componentes principales son el sistema fluídico, los sistemas ópticos (tanto de excitación como de recolección de la emisión lumínica) y los elementos de detección electrónica (o detectores) que están comunicados con un ordenador, donde se guardan y analizan los datos en diferentes programas. En esta investigación, empleamos para la adquisición y almacenaje de los datos el *software* CytExpert® y para su análisis, Kaluza® y Cytobank®. Estos elementos se representan en la figura 11.

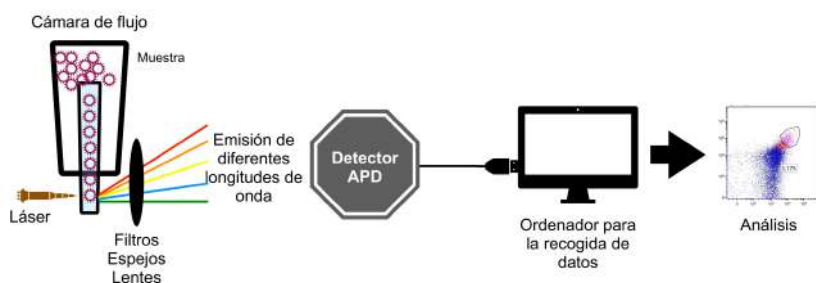


Figura 11. Representación esquemática de los elementos principales para el estudio de muestras mediante citometría de flujo (elementos fluídicos, ópticos y detectores).

3.5.4.2. Análisis de los datos obtenidos mediante citometría de flujo

Mediante la metodología descrita el objetivo es realizar el inmunofenotipado (o caracterización del fenotipo celular) de los subtipos celulares dentro del total de los linfocitos de los pacientes, empleando para ello el marcaje de proteínas de cada célula (intra o extracelulares) mediante múltiples anticuerpos y

su detección a través de citometría de flujo. Para esta identificación, se describe la metodología de análisis con el programa Kaluza®.

Como se ha descrito, con los tubos *DuraClone* se obtienen datos multidimensionales que deben ser reorganizados para su correcta interpretación. Se denomina *gating* al acotamiento de las poblaciones de interés, que se irá realizando de forma correlativa, y permitirá obtener las diferentes poblaciones celulares, caracterizadas por la expresión (o ausencia de expresión) de un conjunto de moléculas.

En nuestro caso, se emplearon gráficos con dos parámetros, plasmados en los ejes X e Y, sobre los cuales, se sitúan puntos que representan cada uno de los eventos registrados para esos marcadores y simboliza cada una de las células analizadas. A su vez, el gráfico puede dividirse en cuatro cuadrantes que diferencian a las células en función de si son positivas o negativas para dichos marcadores, de modo que, en el cuadrante superior derecho se encontrarán las células positivas para ambas moléculas, y en el inferior izquierdo, las células doblemente negativas. Así mismo, en el cuadrante superior izquierdo, estarán las células cuyo marcador representado en el eje X sea negativo, y en el eje Y, positivo; mientras que en el inferior derecho se muestran las células con resultados opuestos.

Por otro lado, en ese mismo tipo de gráfico, se puede acotar exclusivamente el subgrupo poblacional que sea de nuestro interés. Se puede ver un ejemplo en la figura 12.

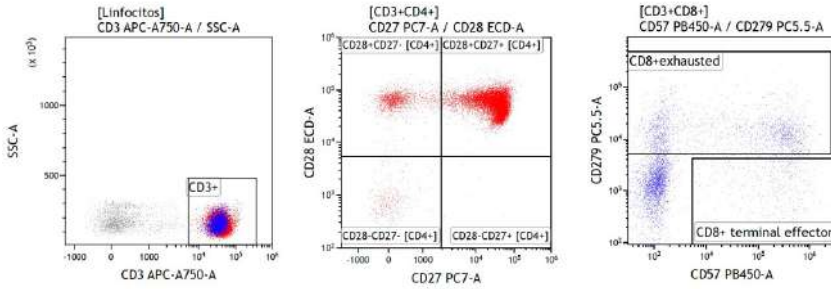


Figura 12. Gráficos de puntos definidos por dos variables (en eje X e Y) para el análisis de linfocitos T. Se han coloreado los linfocitos CD8⁺ en azul y CD4⁺ en rojo.

Para el estudio se emplearon protocolos predefinidos para la caracterización de las subpoblaciones celulares, ya que esto facilita el análisis así como la reproducibilidad de los datos. No obstante, algunas poblaciones fueron definidas a posteriori, en función de nuestras necesidades. Se tomó como ejemplo el protocolo definido por las instrucciones de *Beckman Coulter*®, y a partir de éste, y basándonos trabajos previos se definieron los protocolos definitivos que se detallan a continuación [273, 274]. La estrategia de análisis de los linfocitos T incluye los siguientes *gates*:

- ▶ SCC-CD45 para definir los leucocitos viables.
- ▶ A los leucocitos viables se aplica SCC-CD3 para obtener los linfocitos T.
- ▶ A partir de este subgrupo se imputan CD8-CD4 para obtener las poblaciones CD8⁺CD4⁻ y CD8⁻CD4⁺ (cuadrante superior izquierdo e inferior derecho, respectivamente).

- ▷ A ambas poblaciones obtenidas (así como al total de linfocitos T) se aplican los marcadores:
 - CD279-CD57 para obtener los linfocitos exhaustos (región superior) y efectores terminales (región inferior derecha).
 - CD27-CD28 y CCR7-CD45RA para obtener las subpoblaciones de linfocitos inmaduros, centrales de memoria, efectores de memoria y TEMRA
 - CD27-CD57 para obtener linfocitos altamente diferenciados (en el cuadrante inferior derecho).

Estos *gates* se representan en las figuras 13-A y 13-B.

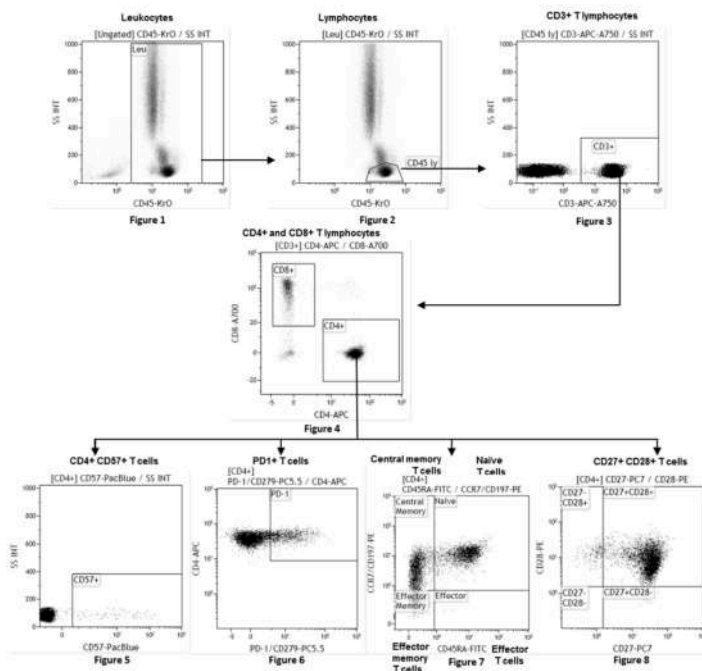
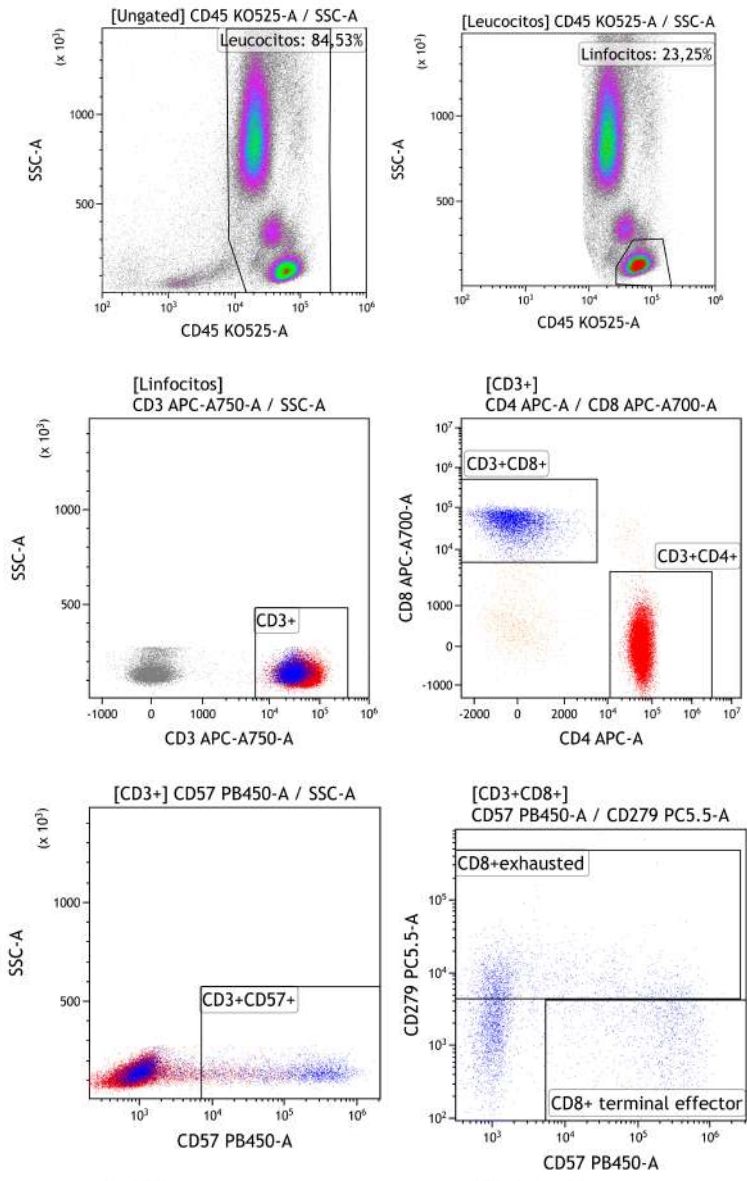
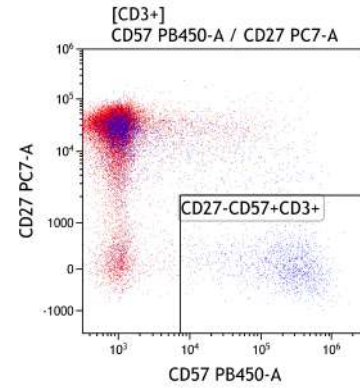
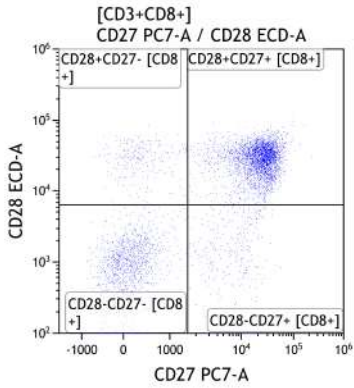
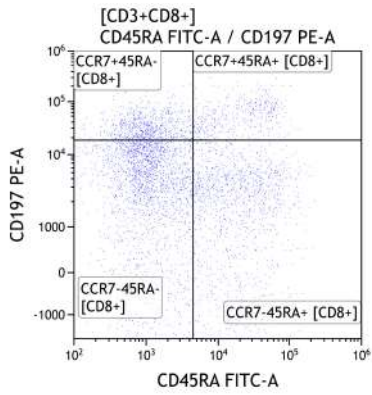
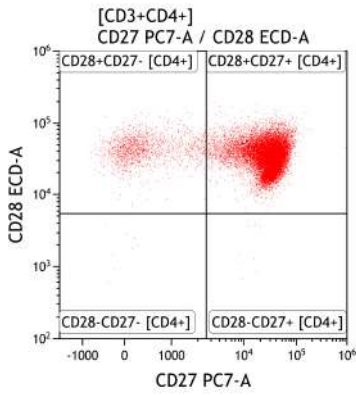
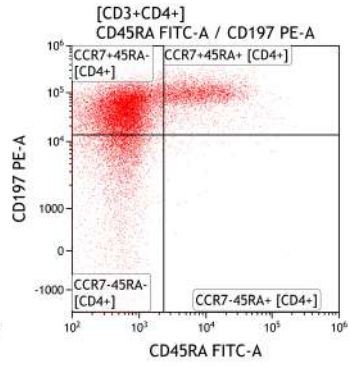
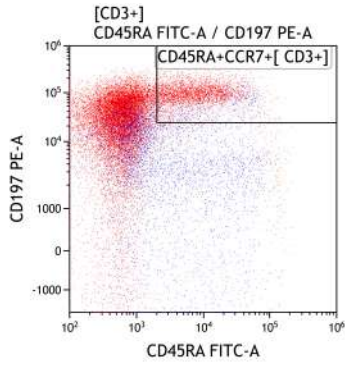


Figura 13-A. Protocolo de análisis para la distribución de los linfocitos T facilitado por Beckman Coulter® (en blanco y negro).





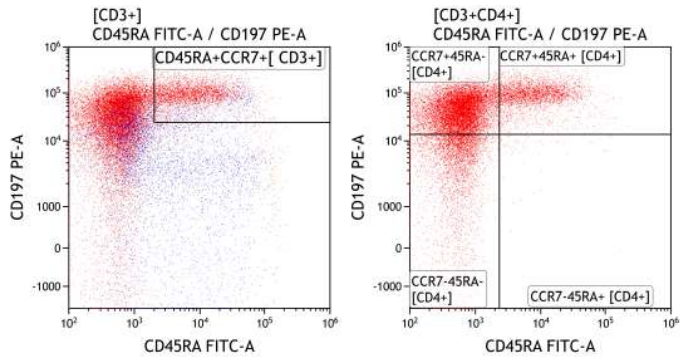


Figura 13-B. Protocolo definitivo del estudio para el análisis de la distribución de los linfocitos T (imágenes en color).

Para realizar análisis del TCR se emplearon los siguientes *gates*, representados en las figuras 14-A y 14-B:

- ▷ SCC-CD45 para definir los leucocitos viables.
- ▷ A los leucocitos viables se aplica SCC-CD3 para obtener los linfocitos T.
- ▷ A partir de este subgrupo se imputan CD8-CD4 para obtener las poblaciones CD8⁺CD4⁻ y CD8⁻CD4⁺ (cuadrante superior izquierdo e inferior derecho, respectivamente).
- ▷ Por otro lado se aplica gd-ab (gamma-delta y alfa-beta), situados en el cuadrante superior izquierdo e inferior derecho, respectivamente. Para aplicar posteriormente:
 - Sobre los linfocitos T $\gamma\delta$ se imputa VD2-VD1.
 - Sobre los linfocitos T $\alpha\beta$ se imputa CD8-CD4.

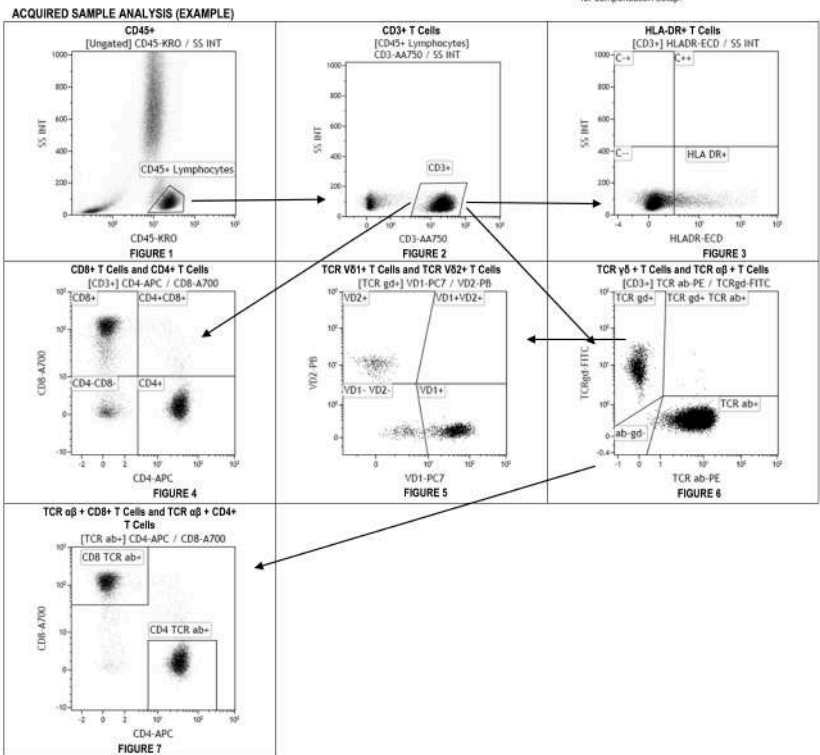
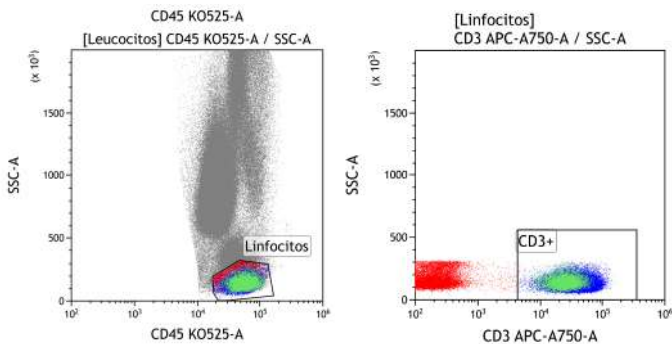


Figura 14-A. Protocolo de análisis para la distribución del TCR facilitado por Beckman Coulter® (en blanco y negro).



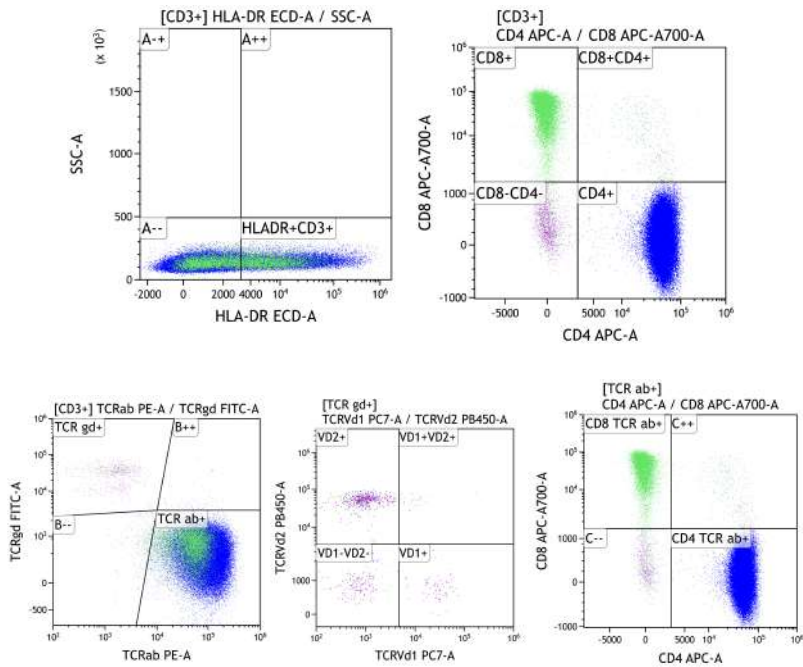


Figura 14-B. Protocolo de definitivo del estudio para el análisis de la distribución del TCR (en color).

En el caso del protocolo de análisis de los linfocitos T reguladores se emplearon los siguientes *gates*:

- ▷ SCC-CD45 para definir los leucocitos viables.
- ▷ A los leucocitos viables se aplica SCC-CD3 para obtener los linfocitos T.
- ▷ A partir de este subgrupo se imputan CD4-CD3 para definir el subgrupo CD3⁺CD4⁺ situado en el cuadrante superior derecha del gráfico.
- ▷ A partir de los linfocitos T CD4⁺ se aplican distintos marcadores de forma sucesiva:
 - CD25-CD4.

- FoxP3-CD4.
- Helios-CD4. Distingue a los linfocitos T reguladores derivados del timo.
- CD39-CD4. Permite hallar los linfocitos efectores de memoria.
- CD45RA-CD4. Con este marcador se obtendrán los linfocitos reguladores inmaduros.

Por último, dentro de los linfocitos CD4⁺ se aplicaron los siguientes marcadores:

- Helios-FoxP3.
- CD25-FoxP3 (dentro de los linfocitos T CD4⁺), define de forma más exhaustiva los linfocitos T reguladores.

Pueden observarse en la figura 15-A, 15-B y 15-C.

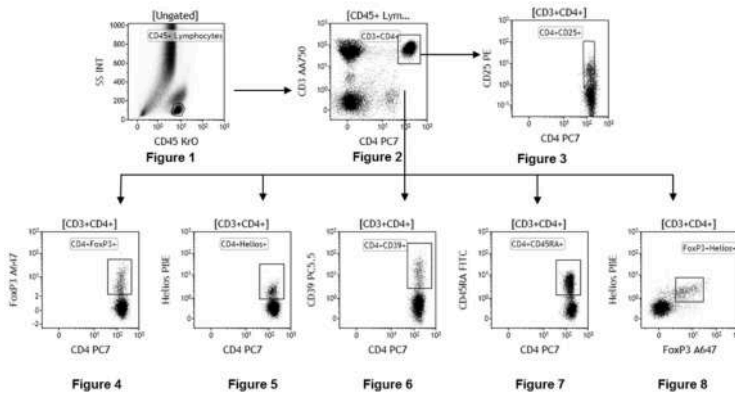


Figura 15-A. Protocolo de análisis para los linfocitos T reguladores facilitado por Beckman Coulter® (en blanco y negro).

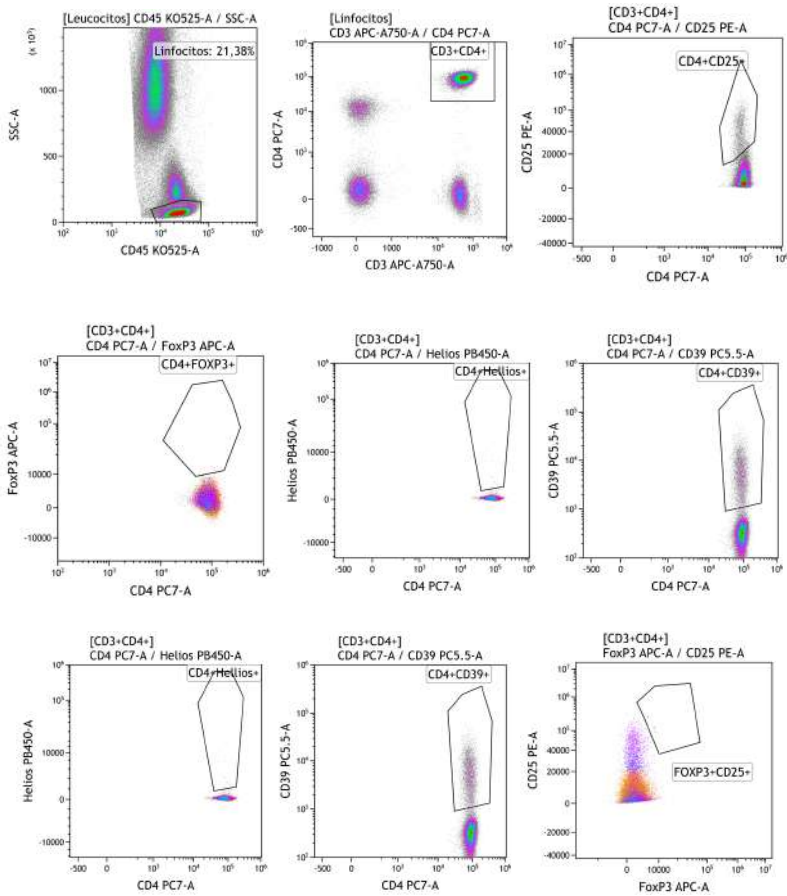


Figura 15-B. Protocolo inicial del estudio para el análisis de los linfocitos T reguladores (en color).

Finalmente, se adaptó el protocolo para el análisis de los linfocitos T reguladores añadiendo la determinación de CD127. El protocolo final se muestra a continuación (partiendo de la adquisición de linfocitos CD4⁺ que se muestra en el protocolo original).

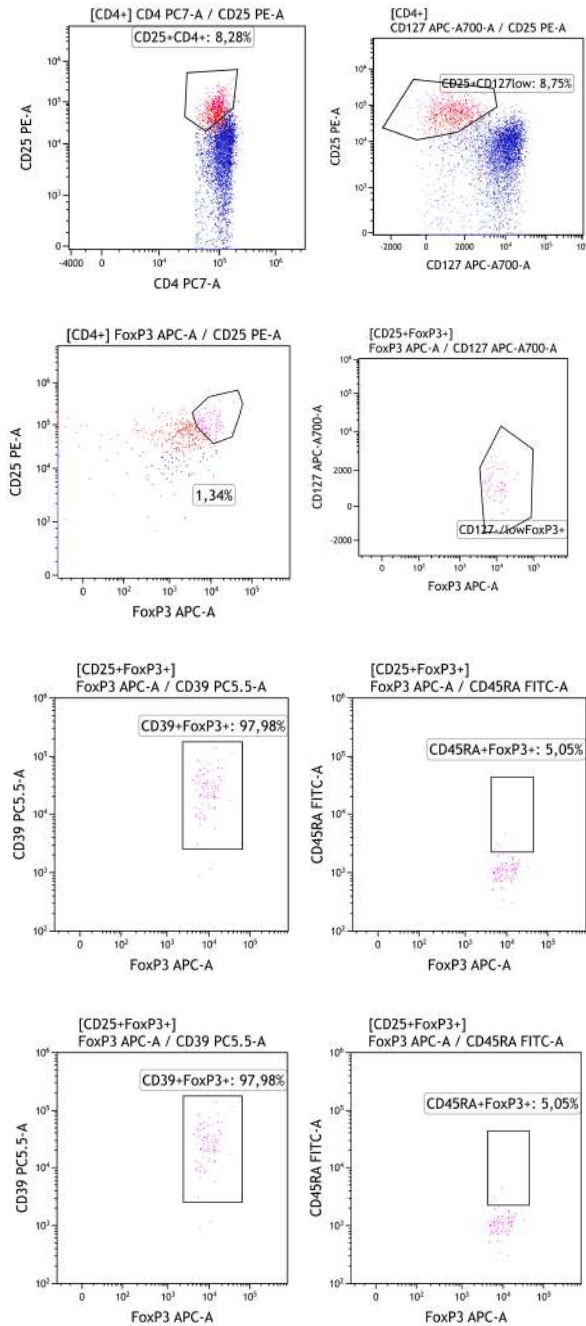


Figura 15-C. Protocolo definitivo de análisis para los linfocitos T reguladores (en color).

Por último, se detalla el protocolo de análisis de las células dendríticas y se acompaña con las figuras 16-A y B:

- ▶ SCC-CD45 para definir los leucocitos viables. En este gráfico (en la región inferior derecha) se seleccionan las poblaciones de linfocitos y monocitos para definir los siguientes *gates*.
- ▶ Al conjunto linfo-monocítico se aplica HLA.DR-linaje negativo para obtener las células dendríticas.
- ▶ A partir de este subgrupo se imputan CD123-CD11c para distinguir las células dendríticas plasmocitoides (región superior izquierda) y mieloides/convencionales (derecha).
- ▶ Dentro de los mDC (definidos por CD11c) se realizan nuevos análisis para determinar 3 subpoblaciones:
 - CD11c-CLEC9A.
 - CD11c-CD16. Permite determinar los mDCs inflamatorios.
 - CD11c-CD1c.

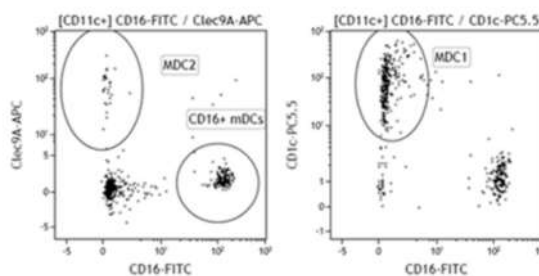


Figure 1: Expression of Clec9A by MDC2

Figure 2: Expression of CD1c by MDC1

Figura 16-A. Protocolo de análisis para la distribución de las células dendríticas facilitado por Beckman Coulter® (en blanco y negro).

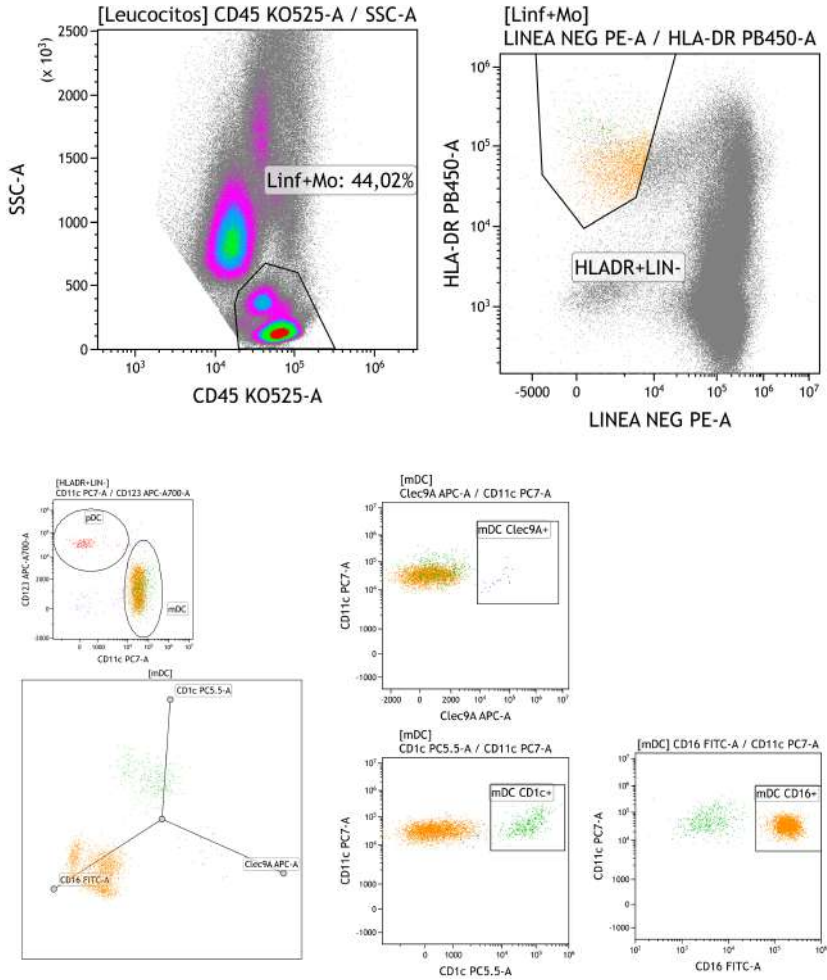


Figura 16-B. Protocolo definitivo del estudio para el análisis de la distribución de las células dendríticas (en color).

De este modo, se obtuvieron los diferentes subgrupos celulares como el porcentaje de eventos positivos respecto al grupo celular que lo contiene (ejemplo, porcentaje de linfocitos $CD28^+CD27^+$ dentro de los linfocitos $CD4^+$, y éstos, dentro de los

CD3⁺). Posteriormente se realizó el cálculo del número absoluto de células/ μ l a partir del conteo celular de los linfocitos del hemograma básico.

3.6. Metodología estadística

La mayor parte de los análisis estadísticos realizados en esta tesis han sido llevados a cabo mediante el lenguaje de programación R (versión 4.2.1) utilizando la interfaz RStudio (versión 2022.07.1), a excepción de la imputación de datos y el análisis *clustering*, que se programó en Python. A continuación, se describen los métodos aplicados para cada tipo de análisis y las librerías de R o Python utilizadas en cada caso.

3.6.1. Imputación de valores faltantes

La base de datos contenía valores faltantes (perdidos) en la mayoría de variables. Para no reducir el tamaño muestral disponible eliminando aquellos pacientes con valores faltantes en alguna de las variables, se decidió imputar los valores 171 faltantes de las variables hematológicas básicas, las poblaciones linfocitarias y las de células dendríticas, que eran las variables clave para la agrupación de pacientes posterior. Se descartaron aquellas variables con un porcentaje excesivo de valores faltantes (superior a un 20%). La imputación de los valores faltantes en las variables restantes se realizó mediante una implementación del método MICE de R [275] en Python.

Este método estima modelos predictivos para cada variable con valores faltantes en función de las restantes utilizando los valores presentes y predice los valores faltantes a partir de los modelos ajustados. Se realizaron las comprobaciones oportunas para asegurar que la imputación de valores faltantes no había modificado la distribución de las variables ni la estructura de la base de datos original.

3.6.2. Relaciones bivariantes entre variables

3.6.2.1. Test de Kruskal-Wallis

La prueba de Kruskal-Wallis [276] se ha utilizado para estudiar el efecto de una variable categórica (factor) sobre una variable numérica. Se considera equivalente al modelo ANOVA pero el test de Kruskal-Wallis es un modelo no paramétrico que no requiere que la variable numérica a analizar siga una distribución de probabilidad normal. La hipótesis nula a contrastar en este caso es que todos los datos provienen de la misma población, frente a la hipótesis alternativa de que proceden de poblaciones distintas. El estadístico del contraste se basa en convertir las observaciones en rangos y su distribución de probabilidad puede aproximarse a una distribución χ^2 .

En este trabajo, se ha utilizado la función *kruskal.test* del paquete básico de R para realizar las pruebas de Kruskal-Wallis, y la librería *ggplot2* para los gráficos de cajas y bigotes incluyendo el p-valor del contraste.

3.6.2.2. Coeficiente de correlación de Spearman

El coeficiente de correlación de rangos de Spearman [277] es una medida de asociación no paramétrica entre dos variables numéricas (continuas o discretas), que mide la dependencia estadística entre los rangos de los valores de dichas variables. Al contrario que el coeficiente de correlación lineal de Pearson, no se ve afectado por posibles valores anómalos o distribuciones asimétricas y, además, permite detectar relaciones no lineales entre las variables. Dada la falta de normalidad o simetría de muchas de las variables incluidas en este estudio y el interés en identificar relaciones entre variables no lineales, se ha optado por aplicar la correlación de Spearman para analizar el grado de dependencia entre variables de tipo numérico. El coeficiente de correlación de Spearman, al igual que el de Pearson, toma valores entre -1 y 1 y se interpreta de igual forma. Valores cercanos a 1 (-1) indicarían relación de tipo creciente (decreciente), mientras que valores cercanos a 0 indicarían falta de relación.

En este trabajo, se ha utilizado la función *cor* del paquete básico de R para calcular el coeficiente de correlación de Spearman y la librería *corrplot* para representar gráficamente las matrices de correlaciones entre variables numéricas.

3.6.2.3. Coeficiente V de Cramér

El coeficiente V de Cramér [278] es una medida de asociación entre dos variables categóricas (nominales). Si creamos una tabla de contingencia (tabla cruzada de

frecuencias) entre las dos variables estudiadas, se puede aplicar un test χ^2 para contrastar la hipótesis nula de independencia entre ambas variables. El estadístico χ^2 utilizado en este test nos da una medida del grado de asociación entre ambas variables: cuanto mayor es el valor del estadístico, mayor es la dependencia entre las variables. Sin embargo, el estadístico χ^2 toma valores entre 0 y $+\infty$, por lo que es difícil determinar el grado de dependencia. La V de Cramér se calcula a partir del estadístico χ^2 , pero se corrige con el número de observaciones y el número de filas y columnas de la tabla de contingencia, de forma que toma valores entre 0 y 1. Así, valores cercanos a 1 indicarán alta dependencia entre las variables y valores cercanos a 0 indicarán independencia entre ellas.

En este trabajo, se ha utilizado la librería de R *rcompanion* para calcular el coeficiente V de Cramér y la librería *corrplot* para representar gráficamente las asociaciones entre variables categóricas.

3.6.3. Relaciones multivariantes: PCA

El Análisis de Componentes Principales (PCA por sus siglas en inglés) [279] es un método multivariante que permite analizar de forma conjunta las relaciones entre múltiples variables, agrupaciones de observaciones y relaciones entre variables y observaciones. Se engloba dentro de las técnicas de reducción de la dimensión porque se basa en generar nuevas variables (componentes principales) que son combinación lineal de las

variables originales. Sin embargo, estas componentes principales están no correlacionadas y es suficiente un número reducido de ellas para explicar un alto porcentaje de la variabilidad de los datos. Además, están ordenadas de forma que la primera es la que explica el mayor porcentaje de variabilidad de los datos y así sucesivamente.

Sea \mathbf{X} la base de datos analizada, con n individuos en las filas y p variables en las columnas. En nuestro caso, se incluyeron en la matriz \mathbf{X} para el modelo PCA solo las variables relacionadas con parámetros inmunológicos e inflamatorios, que son las mismas que posteriormente se utilizarán para agrupar a los pacientes. El resto de variables en la base de datos se utilizó para interpretar los resultados del modelo PCA. Se generaron varios modelos PCA: con las variables relacionadas con poblaciones linfocitarias en número de células por microlitro de sangre (tanto incluyendo todos los pacientes como solo los pacientes ancianos), y otro con dichas variables en porcentaje (esta vez para todos los pacientes). Por último, se generó otro modelo PCA solo con los pacientes a los que se les analizaron las subpoblaciones de linfocitos T reguladores.

La matriz \mathbf{X} se centró y escaló para el modelo PCA, es decir, a cada variable se le restó su media y se dividió por su desviación típica, para evitar que las distintas magnitudes de las variables estudiadas pudieran ser motivo de tener más peso en el modelo. En nuestro caso, se extrajeron $K = 4$ componentes principales en todos los modelos porque consideramos que explicaban un porcentaje suficiente de la variabilidad total de los datos y filtraban el exceso de ruido.

El algoritmo PCA obtiene la matriz de *scores* \mathbf{T} ($n \times K$), que recoge las coordenadas de los individuos en cada una de las componentes principales, esto es, las proyecciones de los individuos sobre el nuevo espacio formado por las componentes principales. También calcula el algoritmo la matriz de *loadings* \mathbf{P} ($p \times K$), que recoge las coordenadas de las variables en cada una de las componentes principales, es decir, las proyecciones de las variables sobre el nuevo espacio formado por las componentes principales. Así, el modelo PCA descompone la matriz \mathbf{X} de la siguiente forma: $\mathbf{X} = \mathbf{TP}^t + \mathbf{E}$. Aquí, \mathbf{E} ($n \times p$) es la matriz de residuos, que recoge la parte de \mathbf{X} que no queda explicada por las componentes principales seleccionadas.

El modelo PCA no solo nos permite proyectar nuestros datos en un espacio de menores dimensiones formado por las componentes principales y así poder entender más fácilmente las relaciones entre variables y/o individuos, sino que también nos permitirá detectar valores anómalos tanto desde el punto de vista univariante (para una sola variable) como multivariante (individuos que no presentan valores extremos en ninguna variable en particular pero destacan por sus valores en un conjunto determinado de variables). Para ello, nos fijaremos tanto en los *scores* \mathbf{T} como en los residuos \mathbf{E} .

Los individuos con valores de *scores* altos son considerados valores anómalos extremos, puesto que dichos individuos pueden estar influyendo enormemente en la generación del modelo PCA. A partir de los *scores* \mathbf{T} , se puede definir el estadístico T^2 -Hotelling que sigue aproximadamente una distribución F , lo que nos permite poder calcular un límite de

confianza de forma que los individuos que lo superen serán candidatos a valores anómalos extremos y se estudiará su posible eliminación del estudio.

En cambio, los individuos con valores residuales altos se consideran valores anómalos moderados, puesto que dichos individuos están mal explicados por el modelo PCA pero, en principio, no son valores influyentes. A partir de la matriz de residuos **E**, se define la Suma de Cuadrados Residual (SCR), también llamada “distancia al modelo PCA”, que sigue aproximadamente una distribución χ^2 , lo que nos permite poder calcular un límite de confianza de forma que los individuos que lo superen serán candidatos a valores anómalos moderados y se estudiará la conveniencia de eliminarlos del estudio.

Para la obtención de modelos PCA y la generación de gráficos de *scores* y *loadings*, se han utilizado las librerías de R *FactoMineR* y *factoextra*, respectivamente. Los gráficos de correlaciones se han generado mediante la librería *corrplot*. Las funciones para realizar los gráficos de detección de anómalos y de contribuciones se han programado específicamente para este trabajo.

3.6.4. Relación de la edad con variables linfocitarias

Dado que la edad es el factor principal en el estudio de la inmunosenescencia, se realizó un estudio para determinar el punto de corte óptimo para la edad, de forma que se observara un cambio significativo en los valores de las variables

linfocitarias antes y después de este punto de corte. Así pues, se buscó un punto de corte entre los 65 y los 82 años que maximizara la diferencia entre los valores de la variable linfocitaria estudiada, tanto en número de células como en porcentaje, en los dos grupos de edad delimitados por dicho punto de corte. Como medidas de discrepancia, se utilizaron dos estadísticos que comparan dos poblaciones: los estadísticos de contraste de la prueba t-Student (función *t.test* del paquete básico de R) y de la prueba no paramétrica de Wilcoxon (función *wilcox.test* del paquete básico de R).

3.6.5. Agrupación de pacientes según sus perfiles inmunológicos

Se aplicó un análisis *clustering* para clasificar a los pacientes en grupos con distintos perfiles inmunológicos determinados por los parámetros inmunológicos e inflamatorios, en concreto, se utilizaron las variables hematológicas básicas, las poblaciones linfocitarias y las de células dendríticas medidas en número de células, centradas y escaladas. Posteriormente, se caracterizaron los grupos creados y se relacionaron con el resto de variables no utilizadas en el análisis *clustering*, tanto las medidas en todos los pacientes como las específicas de los pacientes ancianos. A continuación, se describe la metodología aplicada en cada caso.

3.6.5.1. Análisis “clustering”

En primer lugar, se estudió la tendencia de agrupamiento de los datos mediante el estadístico de Hopkins [280], que toma valores entre 0 y 1. Valores cercanos a 1 indican que existe tendencia de agrupamiento en los datos.

Se compararon varias técnicas de *clustering* en términos del coeficiente de Silhouette [281]. Este coeficiente mide lo bien clasificados que están los individuos en su *cluster* y toma valores entre -1 y 1. Valores negativos indican clasificación incorrecta, es decir, que el individuo está más cerca de otros *clusters* que del *cluster* al que ha sido asignado. Cuanto más cercano a 1 el coeficiente de Silhouette, mejor se ajusta el individuo al *cluster* asignado. Se puede promediar el coeficiente de Silhouette por *cluster* o para todos los individuos, con tal de comparar los resultados de distintos algoritmos de *clustering*.

Las técnicas de *clustering* comparadas fueron las siguientes:

- ▷ Métodos de partición k-medias [282] y k-medoides [283], pero no con las variables originales (algunas muy correlacionadas entre sí) sino con las componentes principales extraídas del PCA de modo que explicaran al menos un 90% de la variabilidad en los datos.
- ▷ *Clustering* jerárquico [284], pero no con las variables originales sino con las mismas componentes principales indicadas para los métodos de partición.
- ▷ *Clustering* difuso (*fuzzy clustering*) [285], sobre las componentes principales.

- ▷ *Spectral clustering* [286], que se aplicó sobre las variables originales ya que el propio algoritmo realiza internamente una reducción de dimensión de la matriz de datos para finalmente aplicar el algoritmo k-medias sobre las nuevas variables o componentes generadas.

Todo el análisis de *clustering* se llevó a cabo en Python y se eligió finalmente el *spectral clustering*, por lo que todos los resultados presentados en este trabajo se basan en esta técnica.

El número óptimo de *clusters* se calculó combinando dos criterios: maximización del coeficiente medio de Silhouette y minimización de la varianza intra-*cluster*.

3.6.5.2. Caracterización de los “clusters” obtenidos: PLS-DA

Para determinar qué variables definían mejor las características de los pacientes asignados a cada *cluster*, se ajustó el modelo de clasificación PLS-DA (Regresión en Mínimos Cuadrados Parciales para el Análisis Discriminante, cuyas siglas proceden del inglés *Partial Least Squares Regression for Discriminant Analysis*) [287].

El método PLS-DA es una variante del método PLS [288] en el que la variable respuesta o dependiente (Y) es una variable categórica, en nuestro caso, los *clusters*. El modelo PLS es también, al igual que el PCA, una técnica de reducción de la dimensión. En este caso, se generan nuevas variables (también combinación lineal de las variables originales), que se llaman

variables latentes o componentes, y que tratan, no solo de maximizar la variabilidad explicada en **X** (variables explicativas o predictoras) o en **Y** (variables respuesta) sino de maximizar la covarianza entre ambas. El modelo se puede definir de la siguiente forma: $\mathbf{Y} = \mathbf{XB} + \mathbf{E}$.

En ésta, **B** es la matriz de coeficientes de regresión y **E** la matriz de residuos. Así pues, los coeficientes de regresión nos servirán para determinar qué variables explicativas (las utilizadas para realizar el *clustering*) nos sirven para caracterizar mejor cada *cluster*. La significación estadística de los coeficientes de regresión del modelo PLS-DA se puede estimar mediante técnicas de remuestreo.

El número de componentes a extraer en el modelo PLS-DA se determinó como aquel que minimizaba la tasa de error de clasificación, que se obtuvo mediante validación cruzada.

3.6.5.3. Relación de los “clusters” con el resto de variables

Finalmente, se realizaron diversos análisis para relacionar los *clusters* obtenidos con el resto de variables que no habían sido utilizadas para generarlos. Se aplicó el test de Kruskal-Wallis para estudiar las diferencias entre *clusters* en las variables numéricas. En cambio, para las variables categóricas, se aplicó un test de independencia. En concreto, el test exacto de Fisher [289], basado en la distribución hipergeométrica, porque al cruzar los *clusters* con algunas variables categóricas se encontraron frecuencias demasiado bajas para aplicar el test χ^2 .

3.7. Aspectos éticos

El estudio fue autorizado por el comité ético de investigación clínica del Departamento de Salud de Valencia Doctor Peset en septiembre de 2017 (código 79/17) y cumple con los preceptos de la declaración de Helsinki.

Todos los pacientes recibieron información sobre el estudio, y aquellos dispuestos a participar en el mismo firmaron el consentimiento informado (se adjunta el documento en el apartado 10). El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajusta a lo dispuesto en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales y a al Reglamento (UE) 2016/679 de Parlamento europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos.

RESULTADOS

*Treballa com si només amb la teua feina
pogueres assolir la meta.*

Jeanne d'Arc

4. Resultados

4.1. Análisis exploratorio de la muestra

En primer lugar, cabe destacar que el análisis descriptivo se ha realizado sobre la muestra global, pero también se han analizado algunas de las variables en el subgrupo de pacientes jóvenes (<70 años) y ancianos (≥70 años). Además, en este segundo grupo, se describirán de forma específica los parámetros de la valoración geriátrica integral.

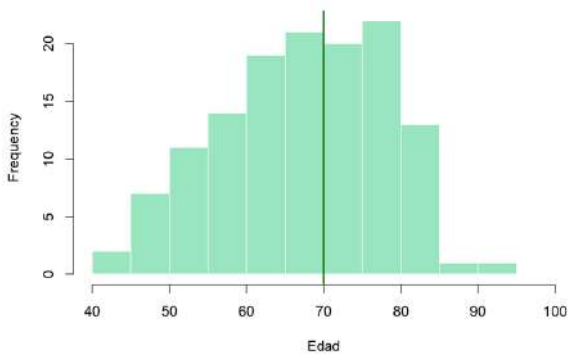
También se ha realizado el análisis agrupando a los pacientes en 4 grupos por su grupo de edad y ECOG, dado que se trata de un parámetro vital en la valoración pronóstica del paciente con CPNM: grupo 1 (pacientes jóvenes con ECOG 0-1); grupo 2 (pacientes ancianos con ECOG 0-1), grupo 3 (pacientes jóvenes con ECOG 2-4) y grupo 4 (pacientes ancianos con ECOG 2-4).

Aunque se han explorado otros cortes de edad (<65 vs 65-74 vs >74 años), estos grupos de edad no mostraron diferencias estadísticamente y clínicamente relevantes en cuanto a las variables clínicas estudiadas, por lo que el resto de análisis se han realizado con el punto de corte en 70 años o bien considerando la edad como una variable continua.

4.1.1. Variables demográficas

4.1.1.1. Edad y sexo

La media y mediana de edad de la muestra fue 67.7 y 68 años respectivamente (rango 42 – 91) (figura 17). Tomando como punto de corte 70 años, el 55% de pacientes se diagnosticaron con <70 años (72/131) y el 45 % se clasificaron como ancianos al diagnóstico (59/131).



*Figura 17.
Histograma de
frecuencias de
la variable edad.*

En cuanto al sexo, la gran mayoría de pacientes de nuestra muestra eran varones (77.9 vs 22.1%).

4.1.1.2. Hábito tabáquico

Tan solo un 9.2% de nuestra población no tenía antecedentes de hábito tabáquico. El resto, presentaban consumo de tabaco en el presente (26%) o en el pasado (65.8%).

4.1.2. Variables clínicas

4.1.2.1. ECOG

La distribución en función de la situación funcional valorada mediante la escala ECOG se representa en la figura 18. Existe un predominio de pacientes con buena situación funcional (ECOG 0 y 1; 69.4%).

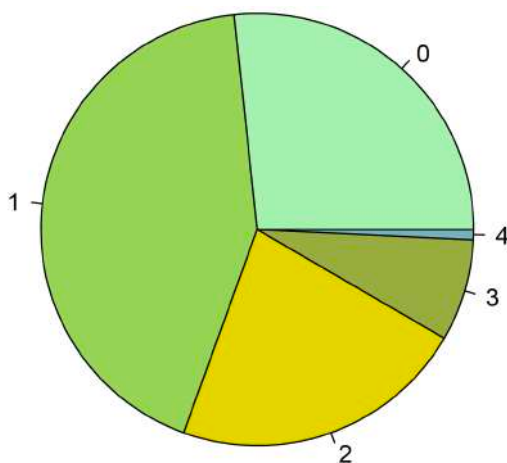


Figura 18. Diagrama de sectores con la variable ECOG.

4.1.2.2. Variables clínicas nutricionales

En cuanto a la situación nutricional, la media de IMC fue 26.3 kg/m²; con una tasa muy baja de pacientes con IMC <20 (6.9% de casos). Por otro lado, un 34.4% de los pacientes presentaban una pérdida de peso significativa (es decir, $\geq 5\%$ en los últimos 6 meses). No encontramos diferencias significativas en cuanto a la pérdida de peso en los grupos de edad, no obstante sí se

hallaron en los grupos que incluían también el ECOG, con un % de pérdida de peso claramente mayor para los grupos 3 y 4, es decir, en aquellos con un ECOG deteriorado (figura 19).

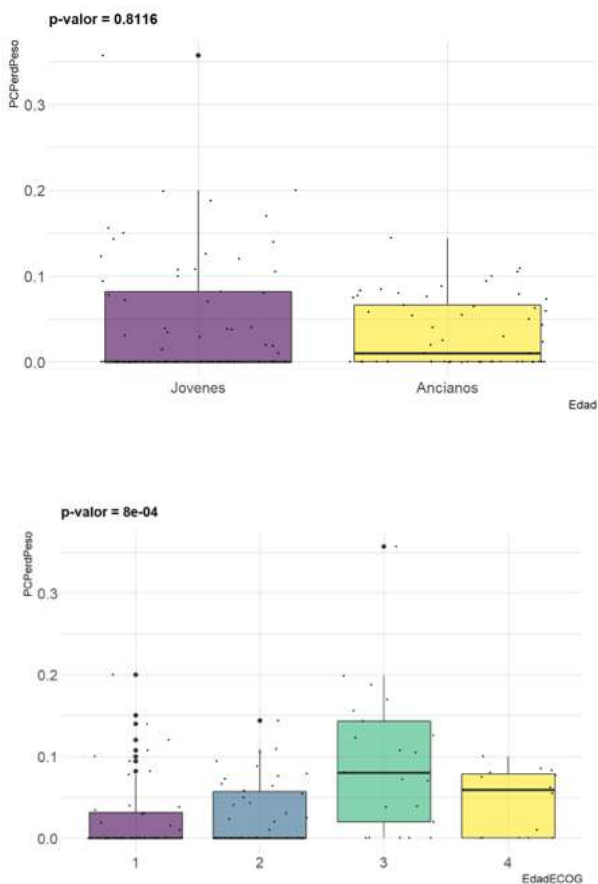


Figura 19. Diagramas de cajas y bigotes que muestran el % de pérdida de peso en pacientes jóvenes y ancianos (arriba) y en los grupos que incluyen la edad y ECOG (abajo). Leyenda: 1 = jóvenes con ECOG 0-1; 2 = ancianos con ECOG 0-1; 3 = jóvenes con ECOG 2-4; 4 = ancianos con ECOG 2-4. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

La valoración nutricional mediante la escala MNA mostró que un 45% tenían un riesgo de desnutrición o criterios de desnutrición establecida. No se encontraron diferencias significativas en el grupo de pacientes jóvenes frente a los ancianos (figura 20-A).

En cuanto a la situación nutricional, el 32.8% fueron clasificados como caquéuticos, mientras que el 10.7% de los casos cumplían criterios de pre-caquexia (figura 20-B).

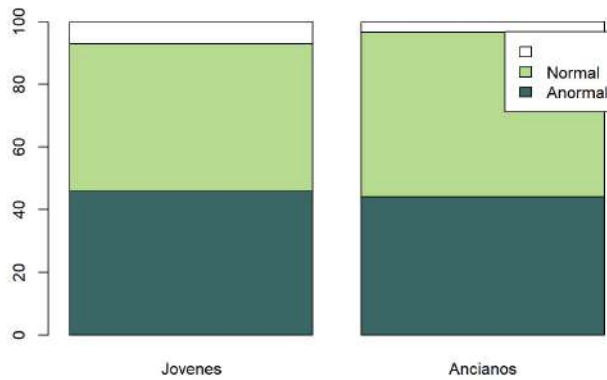


Figura 20-A. Diagrama de barras con la distribución de la variable MNA (mini nutritional assessment) en pacientes jóvenes y ancianos.



Figura 20-B. Diagrama de sectores con la situación nutricional de los pacientes: normal, precaquexia o caquexia.

4.1.2.3. Comorbilidad

Se estudiaron también las comorbilidades más relacionadas con el desarrollo de inmunosenescencia: diabetes mellitus, cardiopatía y presencia de enfermedades neurodegenerativas. La tasa de cada una de ellas en la población global se muestra en la figura 21. La mediana de edad de los pacientes con comorbilidad fue mayor a la de los pacientes que no tenían dichas patologías asociadas de forma estadísticamente significativa (p valor = 0.0055 para diabetes; <0.001 para cardiopatía y 0.009 para las enfermedades neurodegenerativas) (figura 22).

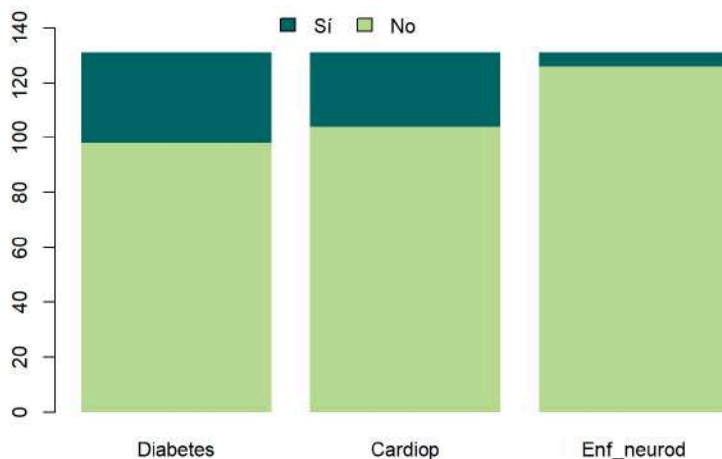


Figura 21. Diagrama de barras con la distribución de las variables diabetes, cardiopatía isquémica (Cardiop) y enfermedades neurodegenerativas (Enf_neurod).

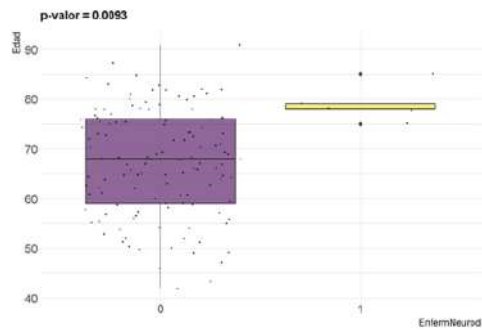
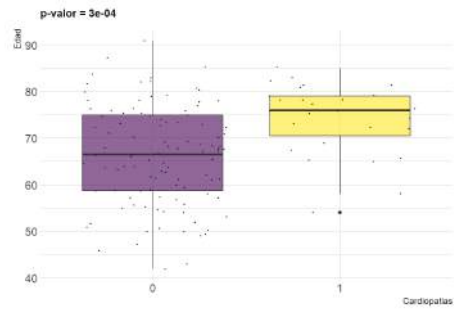
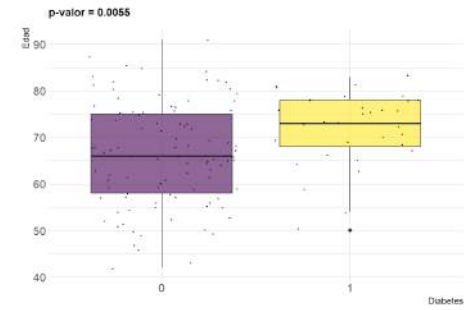


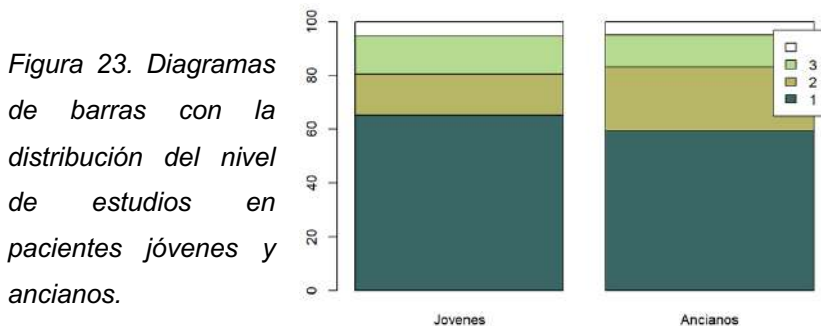
Figura 22. Diagramas de cajas y bigotes que muestran la edad de los pacientes en función de las variables diabetes (arriba), cardiopatía isquémica (centro) y enfermedades neurodegenerativas (abajo).
 Leyenda: 0 = no; 1 = sí.

En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

4.1.2.4. Valoración social y emocional del grupo global de pacientes

A continuación se detalla la valoración de aspectos sociales y emocionales de la población del estudio y, específicamente, la distribución de dichas variables en el grupo de pacientes jóvenes y ancianos.

Casi la mitad de los pacientes tenían estudios elementales (47.3%), con un discreto predominio en el grupo de pacientes jóvenes. Un 10% tenía estudios superiores (figura 23).



Legenda: 1 = elemental; 2 = bachillerato; 3 = universitario; resto no adquiridos).

Respecto a su valoración social, la mayoría de los pacientes del estudio estaban casados (57.3%). El 4.6% eran solteros (todos en el grupo de pacientes jóvenes), el 8.4%, separados (con predominio también en dicho grupo) y el 15.3%, viudos (en este caso, con una mayor tasa en los pacientes ancianos). Del mismo modo, casi 3/4 de los individuos vivían acompañados (73.3%). La distribución por grupos de edad se muestra en la figura 24.

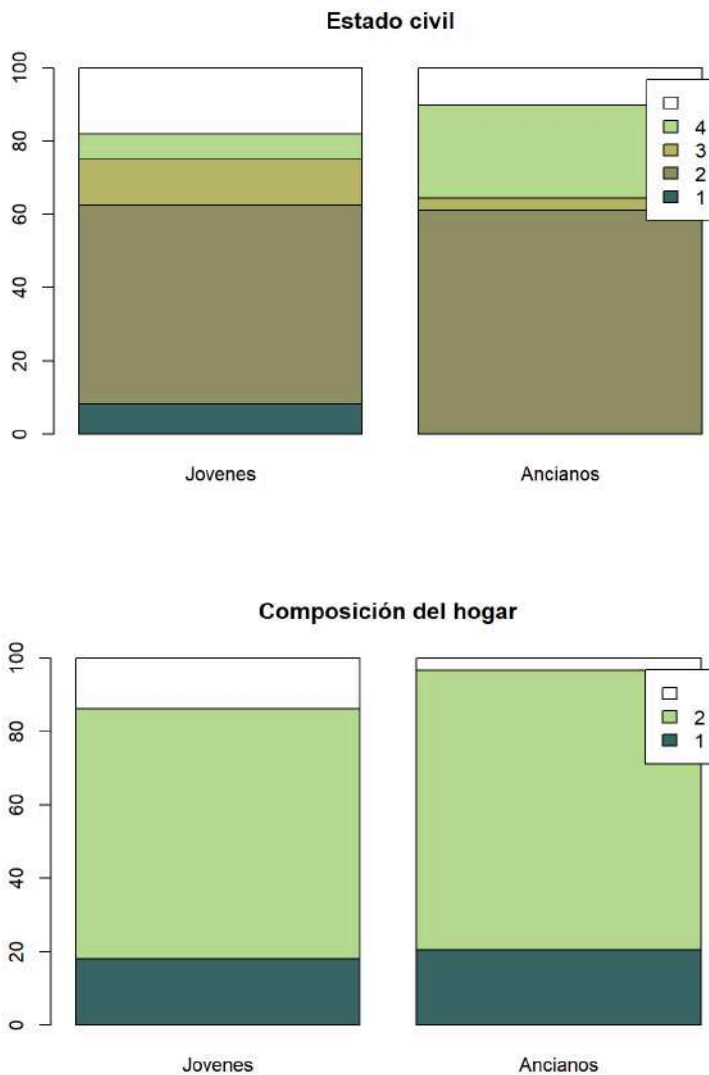


Figura 24. Diagramas de barras con la distribución de pacientes en función de su estado civil (arriba) y composición del hogar (abajo). Leyenda (izquierda): 1 = soltero/a; 2 = casado/a; 3 = separado/a; 4 = viudo/a; resto no adquiridos. Leyenda (derecha): 1 = vive solo/a; 2 = vive acompañado/a; resto no adquiridos).

Por último, en cuanto a la escala MOSs, se observa en la figura 25 que en el grupo de pacientes ancianos la mediana de puntuación es estadísticamente menor frente a los pacientes jóvenes (20 vs 22).

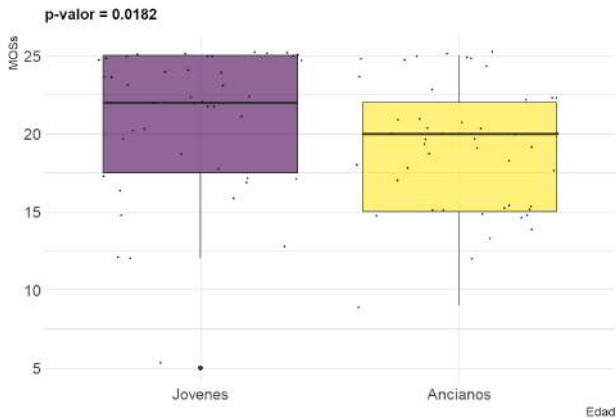


Figura 25. Diagramas de cajas y bigotes que muestran la mediana y rangos de la escala de valoración social MOSs en el subgrupo de pacientes jóvenes y ancianos. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

Para la evaluación de la esfera emocional, se realizaron cuestionarios de ansiedad y depresión. La tasa de pacientes sin criterios de sospecha / confirmación de caso de ansiedad o depresión fue menor en el grupo de pacientes ancianos, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (p valor = 0.176 y 0.413 para ansiedad y depresión, respectivamente).

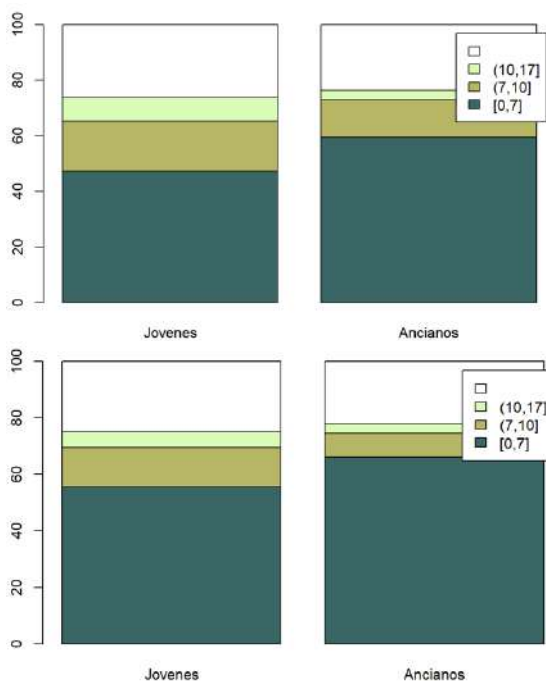


Figura 26. Diagramas de barras con la distribución de las variables ansiedad (arriba) y depresión (abajo) en pacientes jóvenes y ancianos.

Leyenda: [0,7] = no indica caso; (7,10] = caso probable; (10,17] = caso confirmado.

4.1.2.5. Valoración geriátrica integral

En los pacientes con 70 años o más (n = 59), en primer lugar se realizó una de las escalas de cribado geriátrico validadas, denominada G.8. La mayoría de los pacientes tenían una puntuación anormal en dicha escala (69.5%, figura 27). También se determinaron otros factores pronósticos validados en el paciente anciano: número de caídas en los últimos 6 meses y capacidad auditiva.

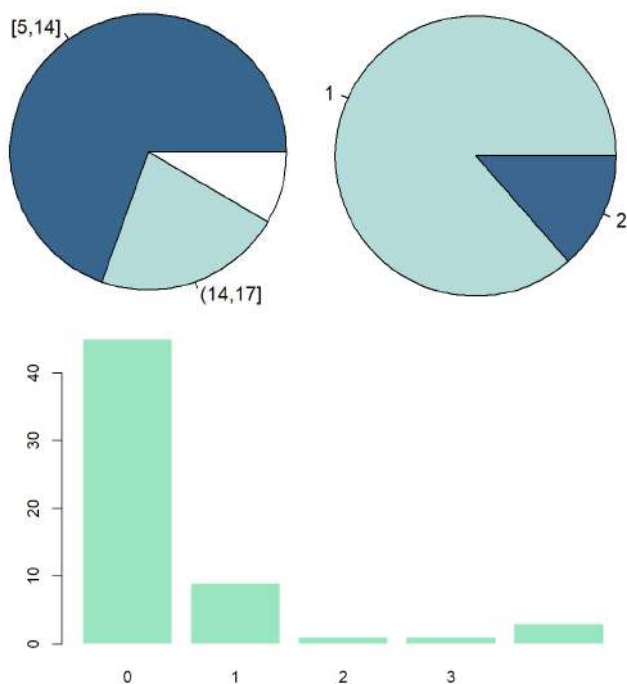


Figura 27. Arriba (izquierda): diagrama de sectores con la clasificación G8. Leyenda: [5,14] = anormal; (14,17] = normal; resto no adquirido. Arriba (derecha): diagrama de sectores con la capacidad auditiva. Leyenda: 1 = conservada; 2 = alterada. Abajo: diagrama de barras con el número de caídas en los 6 meses previos al diagnóstico de CPNM.

Se completó el estudio con la valoración geriátrica integral que se describe a continuación. Casi todos los pacientes del estudio eran independientes para actividades básicas de la vida diaria, como se muestra en la figura 28 (puntuación Barthel ≥ 60 en 94.4% de los pacientes). No obstante, más de 1/3 de los individuos presentaron dependencia para alguna actividad instrumental (escala de Lawton-Brody anormal en 33.9% de los casos). Estos datos se muestran también en la tabla 1, en

función del sexo. A su vez, casi la mitad de ellos tenían una limitación al menos moderada para la movilidad (medido con la escala SPPB: *short physical performance battery*).

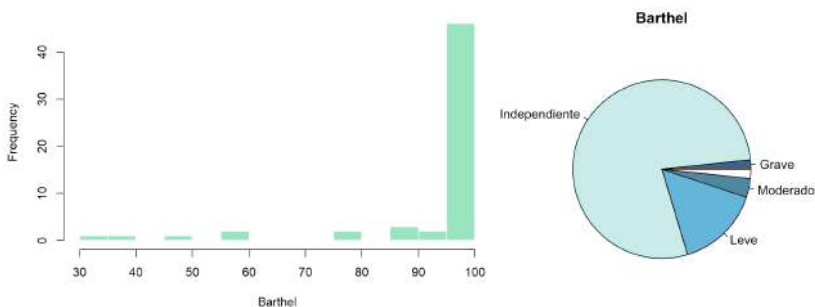


Figura 28. Izquierda: diagrama de barras con la puntuación de los pacientes ancianos según la escala Barthel. Derecha: diagrama de sectores con la clasificación de la escala Barthel en: independencia leve, moderada o grave. Blanco: valores no adquiridos.

En cuanto a la valoración cognitiva, se emplearon 2 escalas: Pfeiffer y el test mini-mental de Lobo. Ambos mostraron que en la población anciana de nuestra muestra un porcentaje aproximado de 8-16% presentaban un diagnóstico de sospecha de deterioro cognitivo (figura 29 y tabla 1).

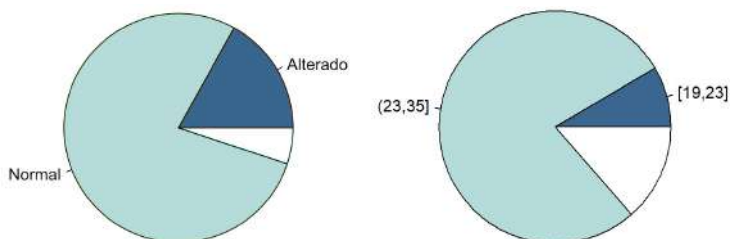


Figura 29. Diagramas de sectores con la clasificación en función de la escala de Pfeiffer (izquierda) y mini-mental (derecha).

La esfera social y emocional había sido evaluada de igual forma en pacientes jóvenes y ancianos (escalas de MOSs y ansiedad/depresión, respectivamente), pero además, en los pacientes ancianos se emplearon escalas validadas específicamente para esta población. En la imagen 30, se muestra que hasta un 16.9% de pacientes ancianos presentaban una situación social severamente afectada.

De un modo similar a lo encontrado con la escala de depresión, en una baja tasa de individuos tenían criterios de depresión establecida (5.1%); no obstante, hasta un 16.9% tenían síntomas de depresión leve (figura 31). Estos datos se resumen también en la tabla 1.

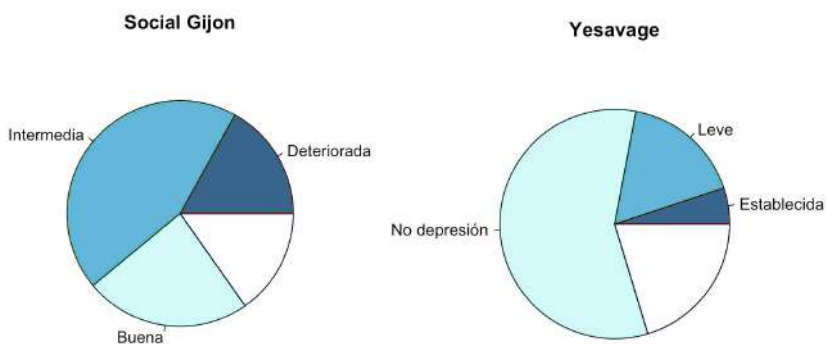


Figura 30 (izquierda). Diagramas de sectores con la clasificación en función de la escala social de Gijón. Figura 31 (derecha). Diagramas de sectores con la clasificación en función de la escala de depresión de Yesavage.

Tabla 1. Resultados de la valoración geriátrica integral, en los pacientes ≥ 70 años ($n = 59$).

Variable	N (%)
G8	
Normal	41 (69.5%)
Anormal	13 (22%)
Valor no adquirido	5 (8.5%)
Capacidad auditiva	
Conservada	51 (86.4%)
Alterada	8 (13.6%)
Nº caídas en los últimos 6 meses	
0	45 (75.3%)
1 o más	11 (18.6%)
No adquirido	3 (5.1%)
Barthel	
Dependencia leve	56 (94.9%)
Dependencia moderada	2 (3.4%)
Dependencia grave	1 (1.7%)
Dependencia total	0 (0%)
Lawton-Brody	
Mujeres ($n = 7$)	
Normal (8 puntos)	4 (57.1%)
Anormal	3 (42.9%)
Varones ($n = 48$)	
Normal (5 puntos)	31 (64.6%)
Anormal	17 (35.4%)
No adquirido ($n = 4$)	
MNA	
Normal (8 puntos)	26 (44.1%)
Anormal	31 (52.5%)
No adquirido	2 (3.4%)

Variable	N (%)
SPPB	
Sin limitación para la movilidad	11 (18.6%)
Limitación leve para la movilidad	7 (11.9%)
Limitación moderada para la movilidad	25 (42.4%)
Limitación severa para la movilidad	3 (5.1%)
No adquirido	13 (22%)
Pfeiffer	
Normal	46 (78%)
Deterioro cognitivo leve-moderado	10 (16.9%)
Deterioro cognitivo severo	0 (0%)
No adquirido	3 (5.1%)
Mini-mental	
Normal	46 (78%)
Anormal	5 (8.5%)
No adquirido	8 (13.5%)
Escala de Yesavage	
Normal	34 (57.6%)
Depresión leve	10 (16.9%)
Depresión establecida	3 (5.1%)
No adquirido	12 (20.4%)
Escala social de Gijón	
Situación social buena	14 (50.2%)
Situación social intermedia	26 (44.1%)
Deterioro social severo	10 (16.9%)
No adquirido	9 (15.3%)

En cuanto al análisis de la comorbilidad analizamos los resultados de la escala acumulativa de tasa de enfermedad para pacientes geriátricos (CIRS-G) y el índice de Charlson. La mediana de puntuación en cuanto a las comorbilidades medidas con CIRS-G fue de 7 puntos, con un rango de 1-22 puntos. En cuanto al índice de Charlson, la mediana fue de 6 puntos, lo que supone una probabilidad de supervivencia a los 10 años alrededor del 2%.

Otro elemento muy relacionado con la comorbilidad, es la toma de fármacos. La mediana número de fármacos que tomaban nuestros pacientes fue 6, con un rango de 0-17 medicamentos.

Finalmente, con todos estos datos, se agrupó a los pacientes en función de su clasificación geriátrica según la escala definida por Balducci y también por SIOG (figura 32). La clasificación como pacientes *fit* fue superponible en ambos casos (33.9 vs 35.6%). No obstante, sí hubo diferencias destacables en el grupo clasificado como pacientes vulnerables (22 vs 55.1%) y frágiles (55.1 vs 16.9%). Además, la escala SIOG incluye un subgrupo más de pacientes, de muy mal pronóstico, clasificados como muy frágiles, del que sólo encontramos un paciente (1.7%).

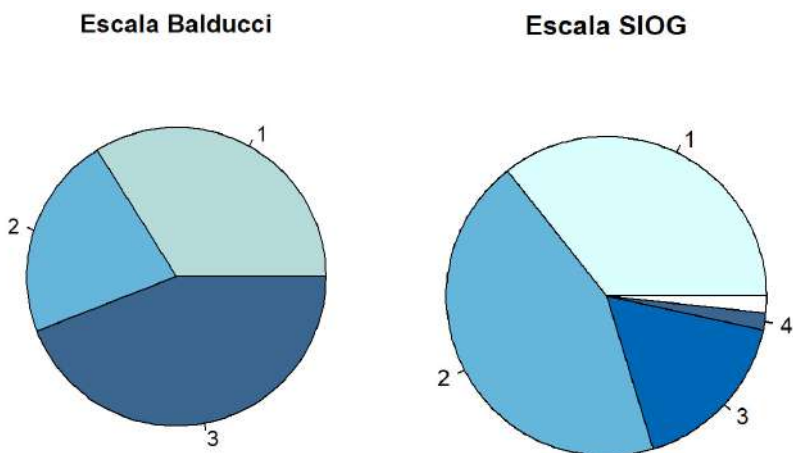


Figura 32. Diagramas de sectores con la clasificación de los pacientes en función de la escala de Balducci (izquierda; leyenda: 1 = “fit”; 2 = vulnerable; 3 = frágil) y SIOG (derecha; leyenda: 1 = “fit”; 2 = vulnerable; 3 = frágil; 4 = muy frágil; resto no adquirido).

4.1.3. Variables del tumor

4.1.3.1. Histología

La histología predominante en nuestra muestra fue el adenocarcinoma (67.2%), seguida del carcinoma escamoso (27.5%). Muy pocos casos fueron de otras histologías (5.3%). Los datos se representan en la figura 33, y muestran que la mediana de edad de diagnóstico de carcinoma escamoso fue mayor que la de adenocarcinoma de forma estadísticamente significativa.

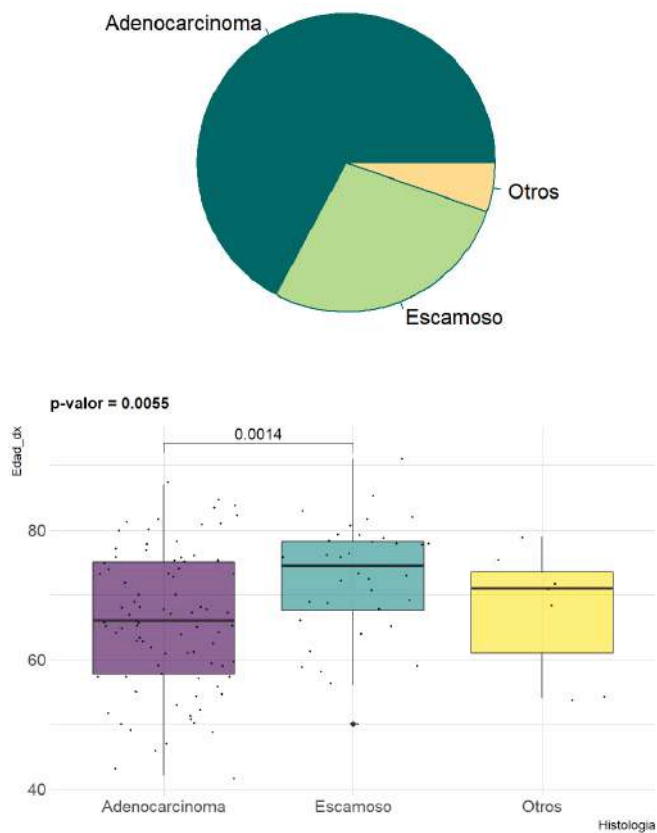


Figura 33. Diagrama de sectores con la clasificación de la histología (arriba) y diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de edad de los pacientes en función de la histología (abajo). A la derecha, en el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

4.1.3.2. Estadío tumoral

Los pacientes de esta muestra se diagnosticaron en su mayoría en estadios localmente avanzados (36.6%) y metastásicos (53.4%). En la figura 34, además de esto, se muestra la mediana de edad de los pacientes en función del

estadio, siendo ésta menor, en estadios tumorales más avanzados.

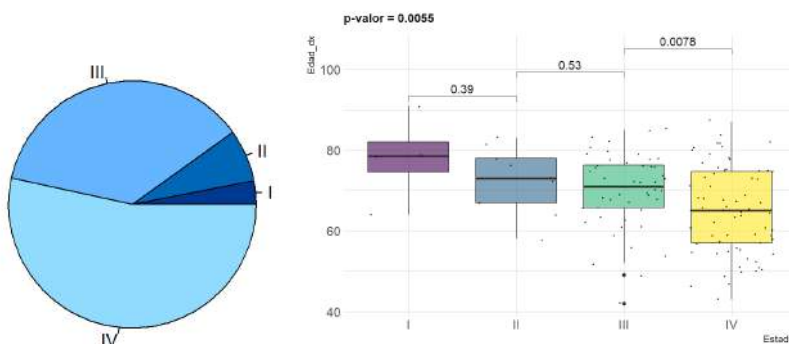


Figura 34. Diagrama de sectores con la clasificación por estadio tumoral (izquierda) y diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de edad de los pacientes en función de la misma variable (derecha). A la derecha, en el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

4.1.3.3. Estatus de PD-L1

De los 131 pacientes de nuestra muestra, se pudo determinar PD-L1 en la muestra tumoral en el 84.7% de los casos. En la figura 35 se muestra la distribución de este marcador. De los 111 pacientes en los que se pudo determinar este marcador un 29.8% presentaban un PD-L1 $\geq 50\%$ mientras que un 45% tenían un PD-L1 negativo y el 25.2% restante un PD-L1 entre 1 y 49%.

No se encontraron diferencias en la expresión de PD-L1 en función de la edad; tampoco en los grupos que incluían el ECOG.

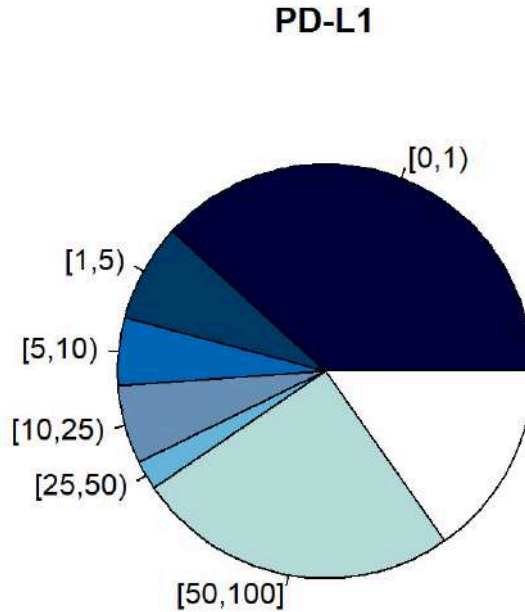


Figura 35. Diagrama de sectores con distribución de la expresión de PD-L1.

4.1.4. Variables analíticas

En las siguientes tablas se reflejan los estadísticos descriptivos principales de todas las variables analíticas analizadas en este estudio (media, mediana, rango y desviación típica).

4.1.4.1. Variables bioquímicas nutricionales e inflamatorias

Tabla 2. Estadísticos descriptivos para las variables bioquímicas nutricionales e inflamatorias.

	Media	Mediana (rango)	Desviación típica
Colesterol total (mg/dl)	168.8	169 (83 – 284)	37.1
Colesterol LDL (mg/dl)	102.8	102.2 (36 – 208)	29
Colesterol HDL (mg/dl)	42.3	41 (13 – 97)	12.6
Lactato deshidrogenasa (UI/l)	268.3	196 (123 – 2120)	261.1
Proteínas totales (mg/dl)	6.9	6.9 (4.7 – 8.9)	0.7
Albúmina (mg/dl)	3.9	3.9 (2.4 – 4.7)	0.5
PCR (mg/l)	42.9	24 (0 – 295)	60.1
IL-6 (pg/ml)	24.8	13.5 (0 – 245.8)	33.7

Con estos hallazgos, decidimos determinar el porcentaje de pacientes de nuestra muestra con hipoalbuminemia (albúmina <3.5 mg/dl), que resultó ser un 16% tanto en la población global como en el grupo de pacientes ancianos. Mientras que los pacientes con PCR elevada (≥ 10 mg/l) suponían un 65% de la muestra, también sin diferencias entre el grupo global y el de pacientes de 70 años o más. En el caso de los pacientes jóvenes, esta tasa fue de un 67%.

4.1.4.2. Parámetros básicos del hemograma

Tabla 3. Estadísticos descriptivos para los parámetros básicos del hemograma.

	Media	Mediana (rango)	Desviación típica
Hemoglobina (g/dl)	13	13 (9.1 – 16.7)	1.7
Leucocitos totales (cél/s/μl)	9309	8400 (2900 - 25900)	3703
Neutrófilos (cél/s/μl)	6725	6000 (1500 – 22300)	3364
Linfocitos totales (cél/s/μl)	1552	1400 (400 – 4300)	733
Plaquetas (cél/s/μl)	285863	269000 (124000 – 709000)	109639

4.1.4.3. Poblaciones linfocitarias básicas

Tabla 4. Estadísticos descriptivos para las poblaciones linfocitarias básicas.

	Media	Mediana (rango)	Desviación típica
Linfocitos T totales (cél/s/μl)	1078	1016 (147 – 2944)	518.7
Linfocitos T CD4 ⁺ (cél/s/μl)	658	606 (81 - 1796)	339.1
Linfocitos T CD8 ⁺ (cél/s/μl)	406	342 (25 – 2087)	305
Linfocitos B (cél/s/μl)	119	88 (12 – 572)	107
Linfocitos NK (cél/s/μl)	253	219 (27 – 918)	164.4

4.1.4.4. Poblaciones linfocitarias específicas

En cuanto a las poblaciones linfocitarias específicas, no existen puntos de corte claros que definan su rango normal en individuos sanos ni en individuos con cáncer, ya que existen modulaciones dinámicas en sus valores [290, 291]. No obstante, con el fin de aportar información en cuanto a los valores y la distribución de las poblaciones linfocitarias y de células dendríticas a la escasa bibliografía existente, el análisis descriptivo se detalla a continuación.

	Media	Mediana (rango)	Desviación típica
CD4 ⁺ inmaduros (céls/ μ l y % de linfocitos)	266 / 17.1%	197 (5 – 1397) / 15.7% (0.5 – 50.6)	222 / 10.6%
CD4 ⁺ centrales de memoria (céls/ μ l y % de linfocitos)	294 / 18.9%	261 (14 - 980) / 18.5% (1.2 – 41.7)	180 / 7.4%
CD4 ⁺ efectores de memoria (céls/ μ l y % de linfocitos)	152 / 9.7%	123 (3 – 843) / 8.5 % (0.6 – 37.6)	117 / 5.7%
CD4 ⁺ TEMRA (céls/ μ l y % de linfocitos)	14 / 1%	2 (0 – 306) / 0.1% (0 – 15.3)	37 / 2.2%
CD27 ⁻ CD57 ⁺ CD4 ⁺ (céls/ μ l y % de linfocitos T)	41.8 / 3.9%	19 (0 – 546) / 1.6% (0 – 40.6)	68.7 / 5.7%
CD8 ⁺ inmaduros (céls/ μ l y % de linfocitos)	49 / 3.1%	33 (1 – 451) / 2.1% (0.1 – 14.7)	57 / 2.7%
CD8 ⁺ centrales de memoria (céls/ μ l y % de linfocitos)	25 / 1.6%	17 (1 – 108) / 1.1% (0.04 – 8.9)	24 / 1.5 %

	Media	Mediana (rango)	Desviación típica
CD8 ⁺ efectores de memoria (céls/μl y % de linfocitos)	100 / 6.3%	78 (0 – 908) / 5.1% (0.1 – 27.5)	104 / 4.6%
CD8 ⁺ TEMRA (céls/μl y % de linfocitos)	114 / 6.8%	64 (1 – 1226) / 5% (0.1 – 37)	165 / 6.6%
CD27 ⁻ CD57 ⁺ CD8 ⁺ (céls/μl y % de linfocitos T)	129 / 10.5%	80 (1 – 1262) / 7.9% (0.1 – 52.8)	170 / 9.7%
CD8 ⁺ exhaustos (céls/μl y % de linfocitos T)	92 / 3.1%	74 (8 – 925) / 8% (1.4 – 31.1)	108 / 5.1%
CD8 ⁺ con diferenciación terminal (céls/μl y % de linfocitos T)	95 / 7.9%	67 (1 – 671) / 5.7% (0.2 – 36.2)	113 / 7.2%
CD25 ⁻ CD127 ^{low} CD4 ⁺ (céls/μl y % de linfocitos)	39 / 2.5%	35 (0 – 138) / 2.4% (0 – 6.4)	27 / 1.4%
Linfocitos T γδ (céls/μl y % de linfocitos)	32 / 2.1%	27 (2 – 126) / 1.9% (0.4 – 6.7)	23 / 1.4%
Linfocitos T Vδ1 ⁺ Vδ2 ⁻ (céls/μl y % de linfocitos T)	11 / 1.1%	6 (0 – 62) / 0.5% (0 – 7.3%)	14 / 1.3%
Linfocitos T Vδ1 ⁻ Vδ2 ⁺ (céls/μl y % de linfocitos T)	16 / 1.6%	10 (0 – 121) / 1% (0 – 8.6%)	17 / 1.7%
Linfocitos T Vδ1 ⁺ Vδ2 ⁺ (céls/μl y % de linfocitos T)	1 / 0.01%	0 (0 – 7) / 0% (0 – 0.4)	1 / 0.04%
Linfocitos T Vδ1 ⁻ Vδ2 ⁻ (céls/μl y % de linfocitos T)	6 / 0.2%	2 (0 – 61) / 0% (0 – 7.9%)	10 / 0.7%

	Media	Mediana (rango)	Desviación típica
Céls dendríticas (DC) (céls/ μ l y % de leucocitos)	20 / 0.3 %	15 (0 – 89) / 0.2% (0 – 1)	17 / 0.2%
mDC (céls/ μ l y % de leucocitos)	14 / 0.2%	9 (0 – 78) / 0.1% (0 – 0.8)	14 / 0.2%
mDC CD1c (céls/ μ l y % de mDC)	4 / 39%	3 (0 – 19) / 34.6% (0 – 93.8)	3 / 24.7%
mDC CD16 (céls/ μ l y % de mDC)	10 / 54.6%	5 (0 – 71) / 60.3% (1.3 – 100)	12 / 27%
mDC Clec9A (céls/ μ l y % de mDC)	0 / 3.5%	0 (0 – 1) / 2% (0 – 32%)	0.2 / 4.7%
pDC (céls/ μ l y % de leucocitos)	4 / 0.1%	3 (0 – 21) / 0.04% (0 – 0.4)	3 / 0.1%

4.1.4.5. Variables serológicas

Prácticamente toda la población de estudio presentaba inmunidad humoral frente a citomegalovirus (tasa de positividad para IgG = 86.3%), y sólo 1 paciente había tenido infección reciente por CMV (IgM positiva).

4.2. Relación entre variables

El análisis de la relación entre variables se ha agrupado en función de parámetros analizados. En primer lugar, se describe la relación bivalente entre las variables clínicas entre sí, a continuación, la relación entre variables clínicas y analíticas y,

posteriormente, la de las variables analíticas entre sí. Por último, se expone el estudio multivariante.

4.2.1. Relación bivariante de variables clínicas

La asociación entre variables categóricas (binarias, nominales y ordinales) se ha calculado mediante la V de Cramér, que toma valores entre 0 y 1. Cuanto más cercano a 1 su valor, mayor es la asociación entre las variables. En la figura 36 estos valores se han expresado en porcentaje.

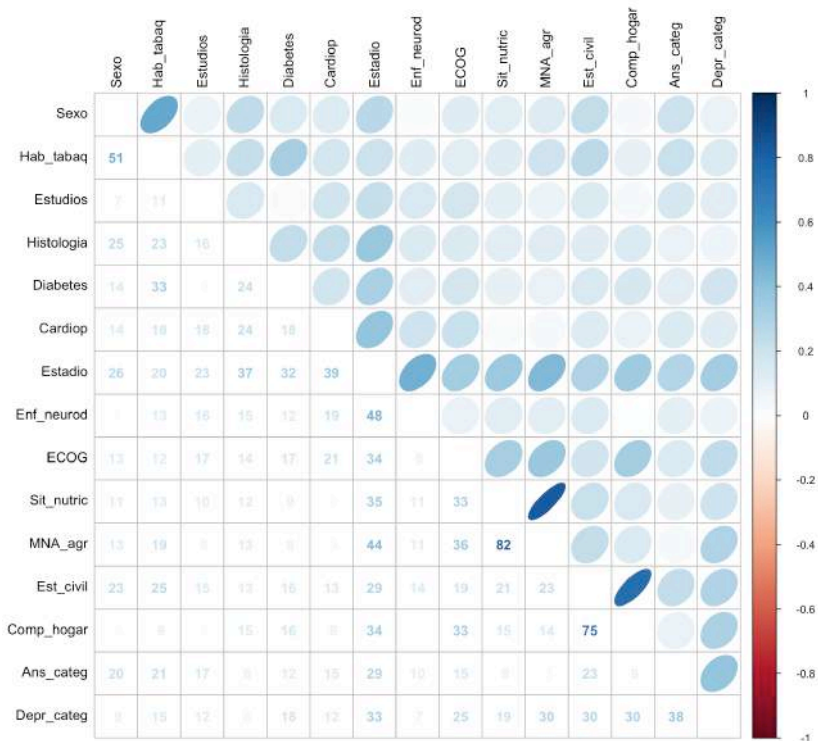


Figura 36. Gráfico que muestra la V de Cramer (0-1) para determinar la correlación entre variables clínicas categóricas.

La asociación entre variables categóricas y numéricas se ha calculado mediante el test de Kruskal Wallis. En el siguiente gráfico, las variables categóricas están en filas y las numéricas en columnas. Los valores representados en el gráfico son $1 - P$ valor obtenido en el test de Kruskal-Wallis. Por tanto, las asociaciones más fuertes son aquellas con valores cercanos a 1.

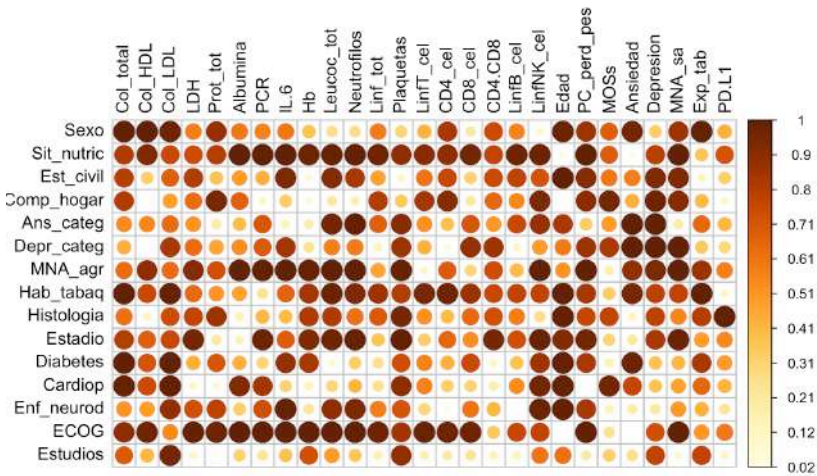


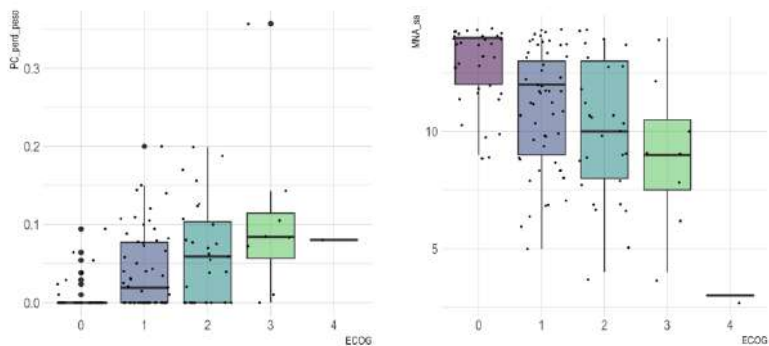
Figura 37. Matriz que muestra la correlación mediante el test de Kruskal Wallis ($1 - p$ valor mediante este test) entre las variables categóricas clínicas y las principales variables numéricas.

4.2.1.1. Relación entre variables clínicas entre sí

Como se observa en la figura 36, sólo existe una asociación fuerte entre la situación nutricional y la escala MNA (ya que comparten algunas variables en su definición, como por ejemplo, la pérdida de peso); y por otro lado, entre la composición del hogar y el estado civil (V de Cramér >60).

Se encontró también una relación moderada (V de Cramér 0.51) entre el sexo y el hábito tabáquico, de modo que el sexo masculino se relacionó más con este antecedente. A su vez, estadios más avanzados se relacionaron con la presencia de enfermedades degenerativas (de forma moderada, V de Cramér 0.48) y con presentar una valoración nutricional alterada, medida con la escala MNA (V de Cramér 0.44). Esta relación entre la situación nutricional y el estadio se confirmó mediante el test de Kruskal-Wallis, de modo que los pacientes con estadio más avanzado presentaban una mayor pérdida de peso (p-valor 0.017).

En la figura 37 destaca también que los pacientes con mayor deterioro funcional según la escala ECOG presentan mayor porcentaje de pérdida de peso y valores más bajos en la escala MNA, indicando un mayor riesgo de desnutrición (p-valor de ambos <0.001) como se muestra en la figura 38, a continuación.



Figuras 38. Diagramas de cajas y bigotes con la mediana y rangos del porcentaje de pérdida de peso (izquierda) y del valor de la escala de MNA (derecha) en función del ECOG.

En cuanto a la situación emocional, el sexo se relacionó con la puntuación en la valoración de ansiedad en la escala de ansiedad-depresión, de modo que las mujeres mostraron puntuaciones mayores que los hombres (p-valor 0.041). A su vez, la sospecha de caso de ansiedad se relacionó con la puntuación en la escala de depresión y viceversa (p-valor <0.001 en ambos casos). Por último, los pacientes con sospecha de cuadro depresivo tenían valores más bajos en la escala MNA (figura 39), y por tanto, mayor riesgo nutricional (p-valor = 0.005). Además, los pacientes que viven solos tuvieron más tendencia a presentar alteración en la escala de depresión (p-valor 0.025).

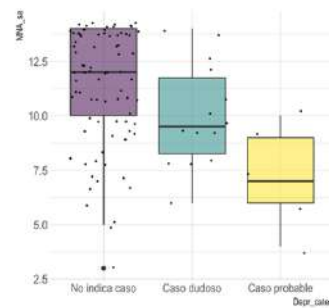


Figura 39. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de la valoración de MNA en función del resultado de la escala de depresión.

4.2.1.2. Relación de las variables clínicas con variables analíticas

En primer lugar, se detallan la relación con las características clínicas de los pacientes. En cuanto a la relación entre las subpoblaciones linfocitarias y el sexo, las mujeres presentaron niveles más altos y porcentaje mayor de linfocitos *naïve* de ambas poblaciones linfocitarias (CD4 y CD8) de forma estadísticamente significativa (p-valores < 0.01).

Se encontró una relación estadísticamente significativa con un *performance status* deteriorado (ECOG elevado) y niveles altos de LDH, PCR, IL-6 y neutrófilos; y niveles bajos de proteínas, albúmina y linfocitos (p valor de cada una de estas variables <0.05). Los pacientes con mayor ECOG también presentaban mayor porcentaje de pérdida de peso (p-valor < 0.001) y alteración en la valoración de la escala MNA (p < 0.001). A modo de ejemplo, se muestran los diagramas de la figura 40-A y 40-B.

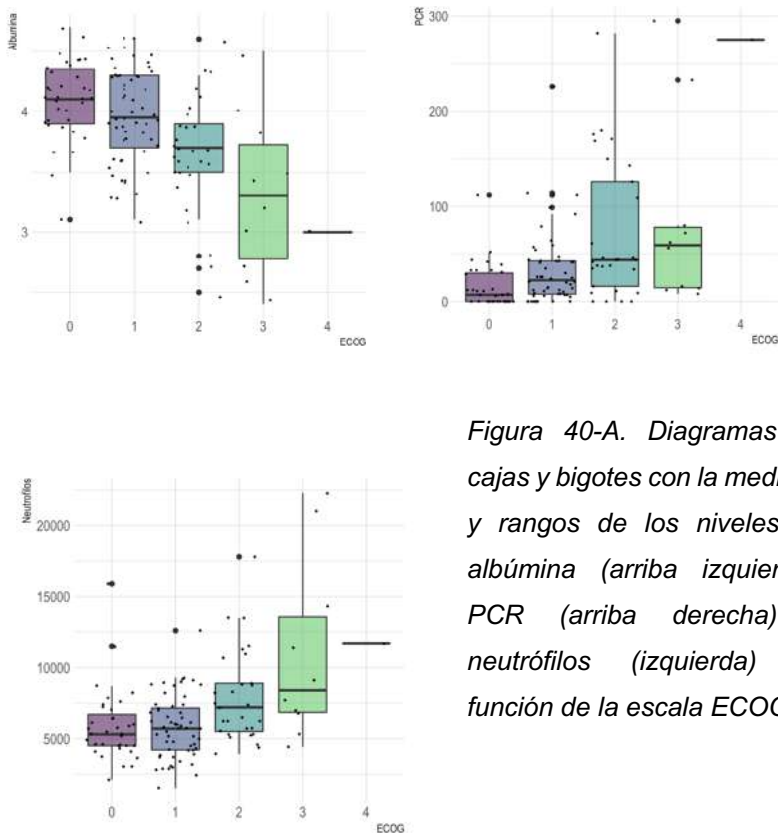


Figura 40-A. Diagramas de cajas y bigotes con la mediana y rangos de los niveles de albúmina (arriba izquierda), PCR (arriba derecha) y neutrófilos (izquierda) en función de la escala ECOG.

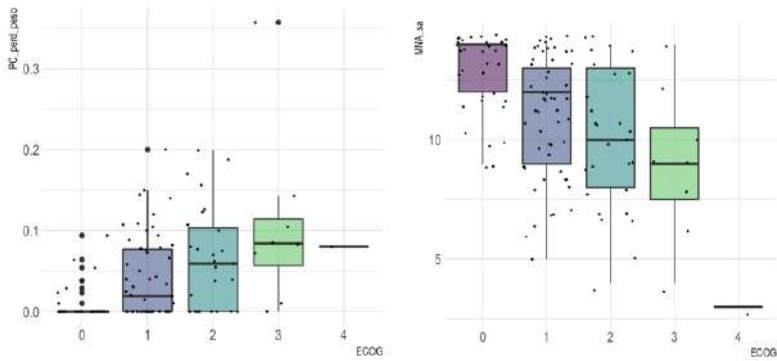


Figura 40-B. Diagramas de cajas y bigotes con la mediana y rangos del porcentaje de pérdida de peso (izquierda), y puntuación en la escala MNA (derecha) en función de la escala ECOG.

De forma específica, la situación funcional se relacionó con los niveles de linfocitos T y con las poblaciones de linfocitos CD4⁺ (p-valor 0.028) y CD8⁺ (p-valor 0.032), sobre todo a expensas de los linfocitos CD4⁺ centrales de memoria y efectores de memoria, cuyos niveles estaban disminuidos en pacientes con ECOG más deteriorado como se observa a continuación. En cambio, no se ha podido establecer un patrón claro relacionado con el ECOG en el caso de las subpoblaciones de linfocitos CD8⁺.

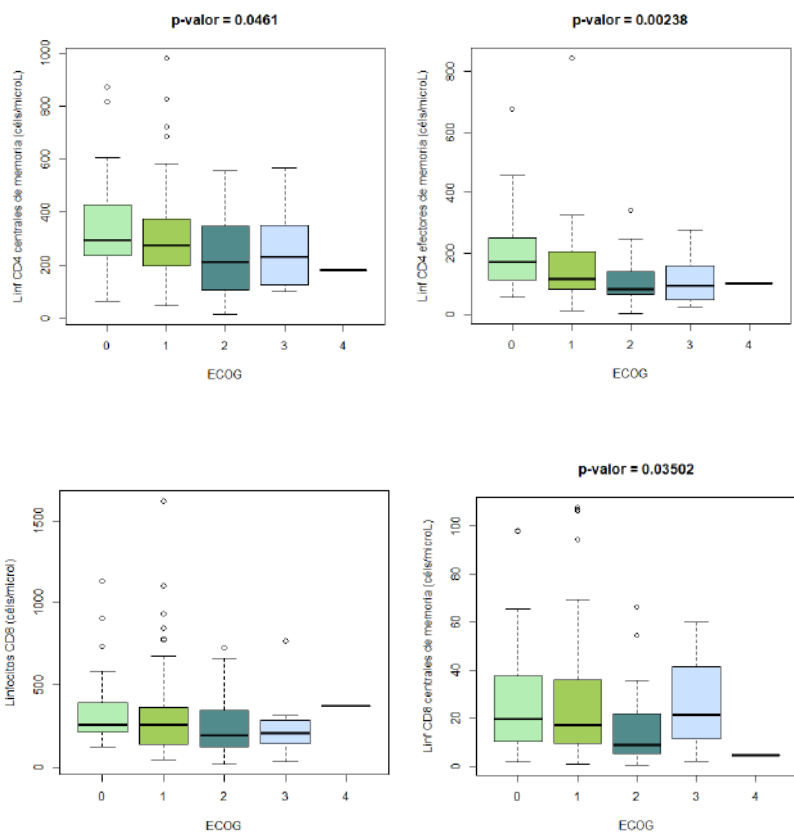
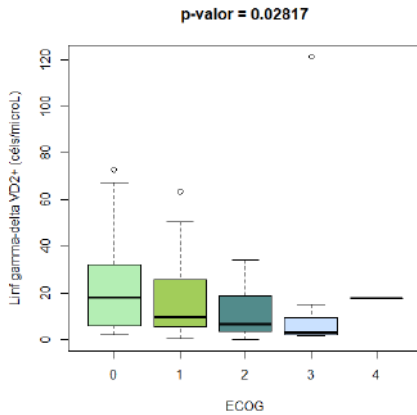


Figura 41-A. Diagramas de cajas y bigotes con la mediana y rangos los niveles de linfocitos CD4⁺ (arriba), y CD8⁺ (abajo) en función de la escala ECOG. En el título de algunos gráficos se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

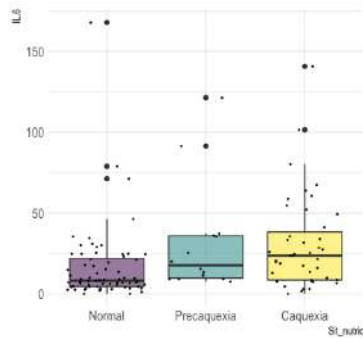


También objetivamos un descenso en los niveles de linfocitos T $\gamma\delta$ $VD1^+VD2^+$ en pacientes con peor situación funcional, salvo en el caso del único paciente que presentaba ECOG 4.

Figura 41-B. Diagramas de cajas y bigotes con la mediana y rangos del número de linfocitos gamma-delta $VD2^+$ en función del ECOG. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

La situación nutricional también mostró un perfil similar al ECOG: aquellos pacientes con estado nutricional deteriorado tenían niveles de albúmina (p-valor = 0.002), hemoglobina (p = 0.027) y linfocitos (p = 0.032) más bajos; y por otro lado, niveles elevados de PCR, IL-6 y neutrófilos (p < 0.001) que aquellos con situación nutricional normal. Se muestra un ejemplo en la figura 42-A.

Figura 42-A. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de los niveles de IL-6 en función de la clasificación nutricional. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.



En relación a las poblaciones linfocitarias aunque se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las células más diferenciadas en función de la situación nutricional, sólo se muestran aquellas relaciones clínicamente relevantes (figura 42-B). En primer lugar, objetivamos un aumento de los niveles de linfocitos B en pacientes con caquexia. Por el contrario, los valores absolutos de linfocitos CD4⁺ maduros (CD27⁻CD57⁺), así como de los linfocitos CD8⁺, se mostraron disminuidos en pacientes con situación nutricional deteriorada.

Los pacientes jóvenes con alteración en el cuestionario MNA mostraban niveles más bajos de linfocitos T CD4⁺ efectores de memoria (p valor = 0.009) y reguladores (CD4⁺CD25⁺; p valor = 0.0365), así como de linfocitos $\gamma\delta$ V δ 1⁻V δ 2⁺ (p valor = 0.0108) aunque esto no pudo corroborarse en el grupo de pacientes ancianos.

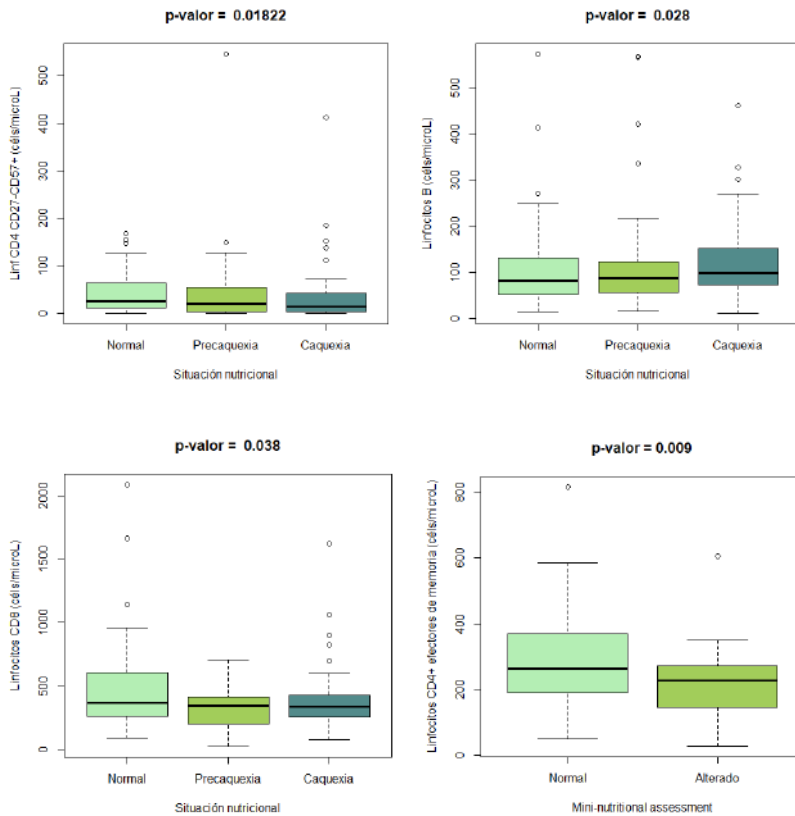


Figura 42-B. Diagramas de cajas y bigotes con la mediana y rangos de los niveles de linfocitos B (arriba izquierda), linfocitos CD8⁺ (arriba derecha) y CD4⁺ maduros (abajo izquierda) en función de la clasificación nutricional. Abajo derecha se muestra la mediana y rango de linfocitos CD4⁺ EM en pacientes jóvenes. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

Centrándonos en las características del tumor, los pacientes con estadios más avanzados presentaban niveles altos de LDH (p-valor 0.015), PCR (p-valor 0.037), neutrófilos (p-valor 0.001; figura 43) y plaquetas (p-valor 0.008).

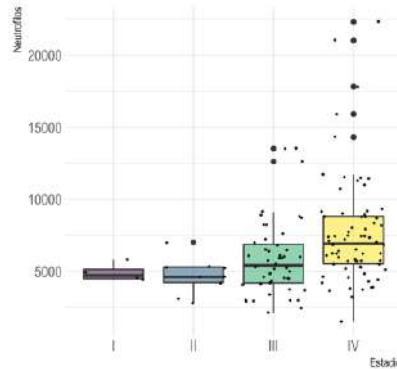


Figura 43-A. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rango del nivel de neutrófilos en función del estadio.

Respecto a las poblaciones celulares, parece existir un descenso progresivo de los niveles de todas las subpoblaciones de células dendríticas, salvo en los pacientes con estadio I, como se muestra en la figura 43-B.

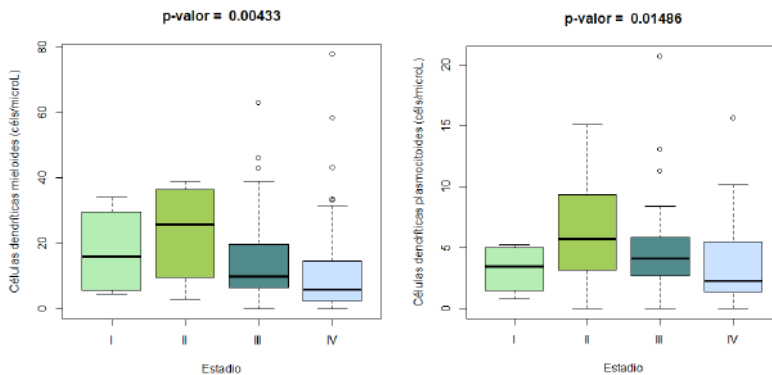


Figura 43-B. Diagramas de cajas y bigotes con la mediana y rango del nivel de células dendríticas mieloides (izquierda) y plasmocitoides (derecha) en función del estadio. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

Los tumores con histología no escamosa y no adenocarcinoma presentaban una mayor expresión de PD-L1 en tumor (p-valor 0.008, figura 44-A).

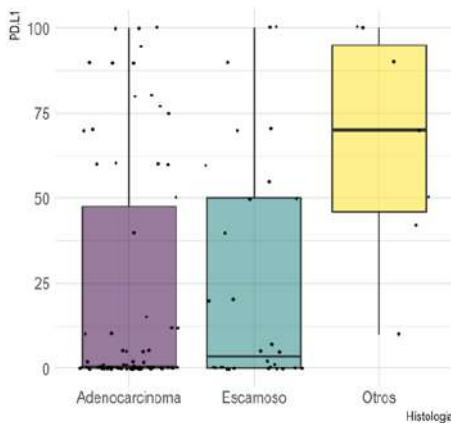
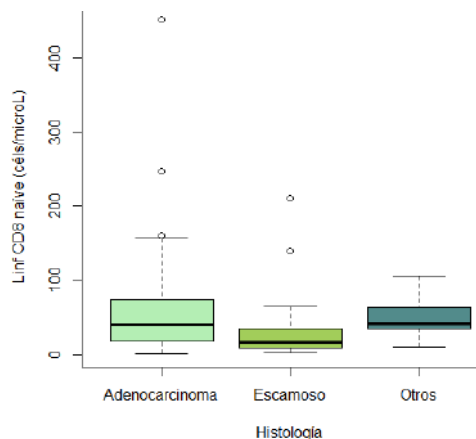


Figura 44-A. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos del porcentaje de expresión de PD-L1 en el tumor en función de la histología.

Por otro lado, los pacientes con tumores de histología escamosa exhibían niveles menores en sangre de linfocitos CD8⁺ naïve (p-valor 0.001, figura 44-B).

Figura 44-B. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de los niveles de células CD8⁺ inmaduras en sangre periférica en función de la histología.



En último lugar, se detalla la asociación entre las poblaciones celulares y los parámetros de la valoración social y emocional en el grupo de pacientes jóvenes; y por otro lado con las variables de la valoración geriátrica integral en pacientes de 70 años o más.

En el grupo de pacientes jóvenes, no encontramos diferencias significativas en los números absolutos o porcentajes de las poblaciones celulares en función de su situación social (incluyendo el estado civil, composición del hogar y escala de MOSs) o emocional (valoración de ansiedad y depresión).

A continuación se especifican, para el grupo de pacientes ancianos, las características de la VGI para las cuales se han encontrado diferencias respecto a subpoblaciones celulares y parámetros inflamatorios en el análisis univariable:

En primer lugar, los pacientes con alteración en la escala de Lawton (que evalúa la dependencia para actividades instrumentales) presentaban menor ratio de linfocitos $CD4^+/CD8^+$, linfocitos T reguladores y linfocitos $\gamma\delta V\delta 1^+V\delta 2^+$, así como niveles más bajos de albúmina.

Aunque se objetivó una tendencia a presentar niveles elevados de moléculas proinflamatorias (como son IL-6 y PCR), estos resultados no fueron estadísticamente significativos.

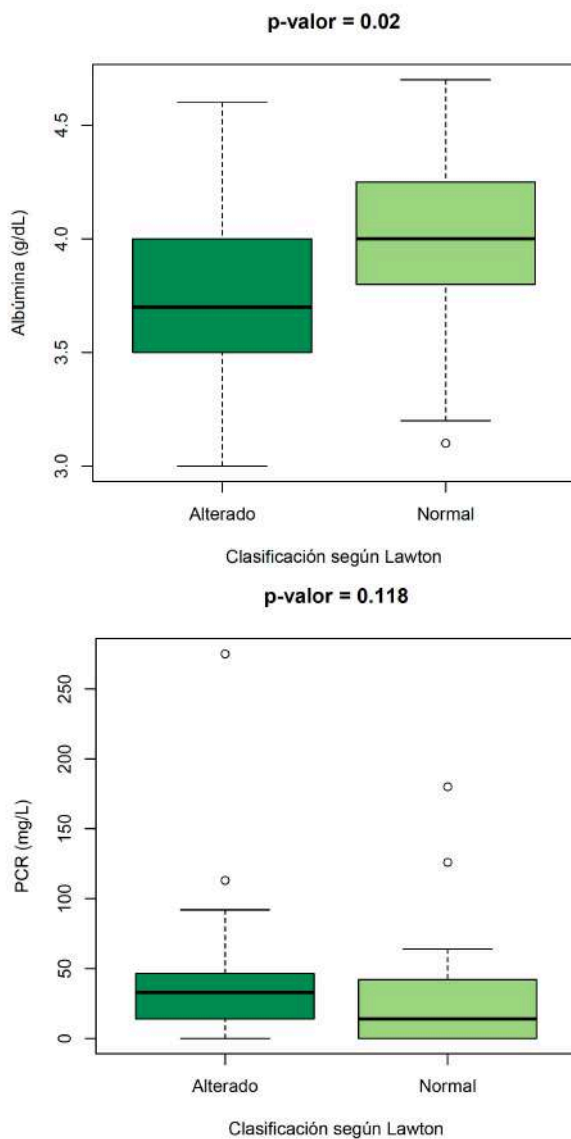


Figura 45-A. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de albúmina (arriba) y PCR (abajo) en función de la valoración por la escala de Lawton. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

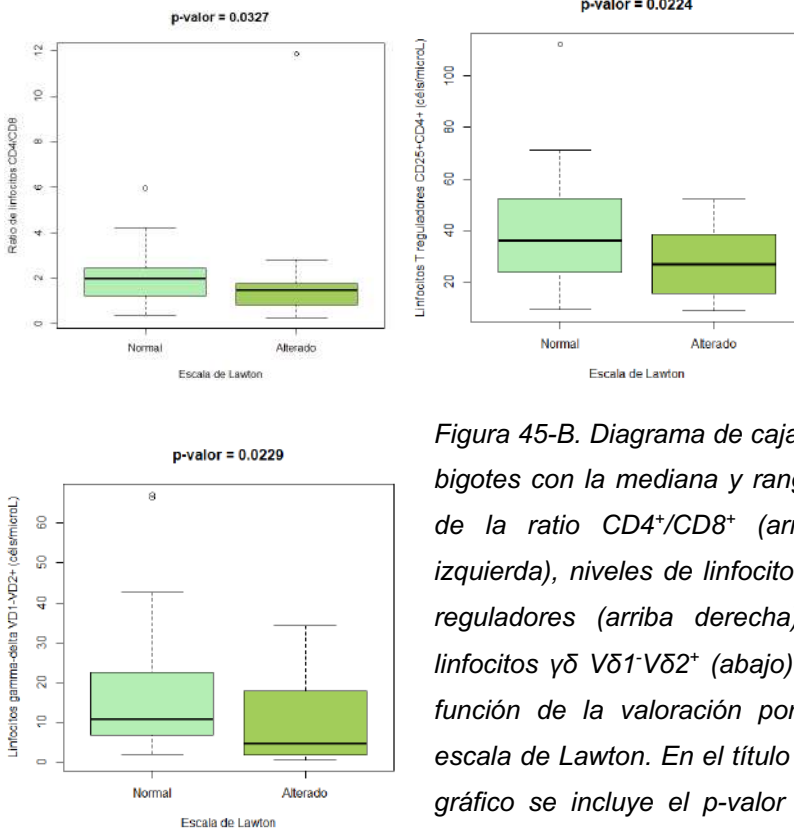


Figura 45-B. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de la ratio $CD4^+/CD8^+$ (arriba izquierda), niveles de linfocitos T reguladores (arriba derecha) y linfocitos $\gamma\delta V\delta1^+V\delta2^+$ (abajo) en función de la valoración por la escala de Lawton. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

La sospecha de depresión se relacionó con niveles más elevados de linfocitos $CD8^+$ exhaustos respecto a pacientes sin sospecha de depresión. Y por otro lado, los pacientes con peor situación social según la clasificación de la escala de Gijón, tenían niveles más bajos de linfocitos $CD8^+$ maduros. Estos datos se muestran gráficamente a continuación.

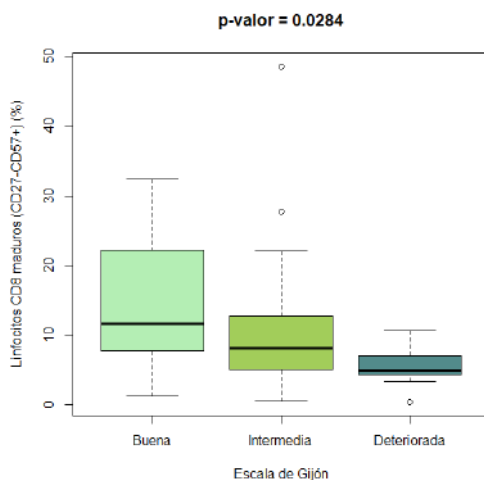
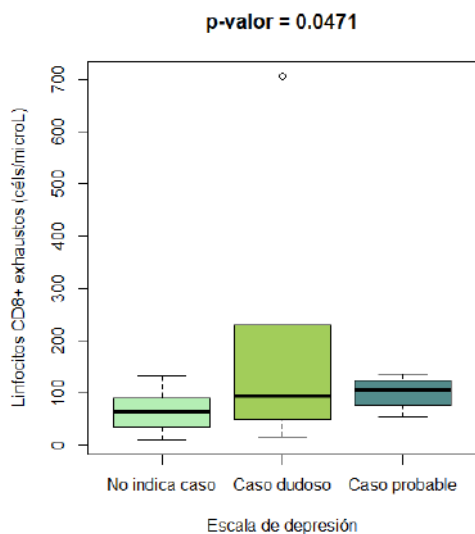


Figura 45-C. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de linfocitos CD8⁺ exhaustos en función de la escala de depresión (arriba) y de linfocitos CD8⁺ maduros en función de la valoración por la escala social de Gijón (abajo). En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

También en la valoración cognitiva se encontraron diferencias significativas en cuanto a los niveles de linfocitos CD8⁺ centrales de memoria y T reguladores, de modo que los pacientes con 2 o más fallos en el test de Pfeiffer presentaban niveles más bajos de ambas poblaciones. Estos datos no se confirmaron mediante la valoración de mini-mental test de Lobo.

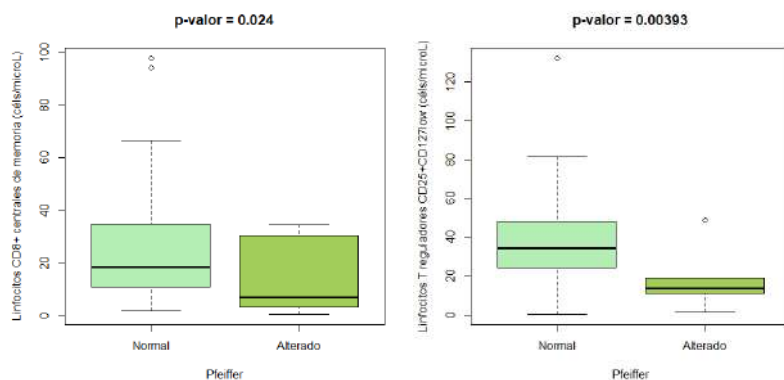


Figura 45-D. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de linfocitos CD8⁺ centrales de memoria (izquierda) y de linfocitos CD4⁺ reguladores (derecha) en función de la valoración por la escala Pfeiffer. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

En cuanto a la polifarmacia, la toma de 3 fármacos o menos, se asoció con niveles más elevados de linfocitos CD8⁺ exhaustos y con niveles más bajos de linfocitos CD4⁺ efectores de memoria (figura 45-E).

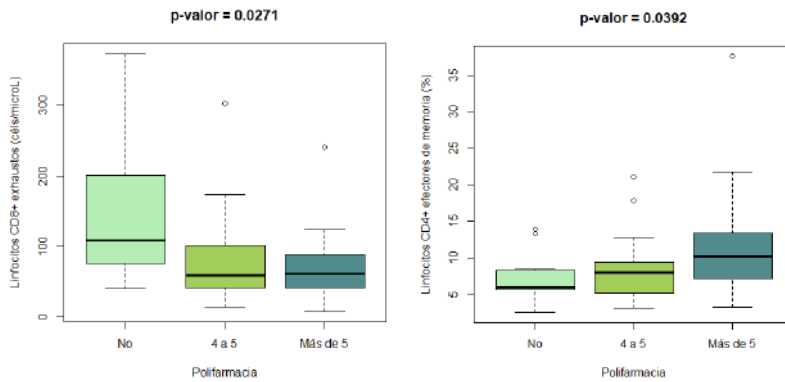


Figura 45-E. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de linfocitos CD8⁺ exhaustos (izquierda) y de linfocitos CD4⁺ efectores de memoria (derecha) en función de la presencia de polifarmacia. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

Como última variable de la VGI destaca que, los pacientes con capacidad funcional en cuanto a su movilidad conservada o con déficit leve, presentaban niveles más elevados de linfocitos T reguladores que los pacientes con limitación moderada o severa en la valoración por la escala SPPB. Analizamos estos dos grupos conjuntamente en cuanto a los parámetros inflamatorios también, y observamos niveles mayores de IL-6 y PCR en los pacientes con limitación funcional moderada o severa de forma estadísticamente significativa.

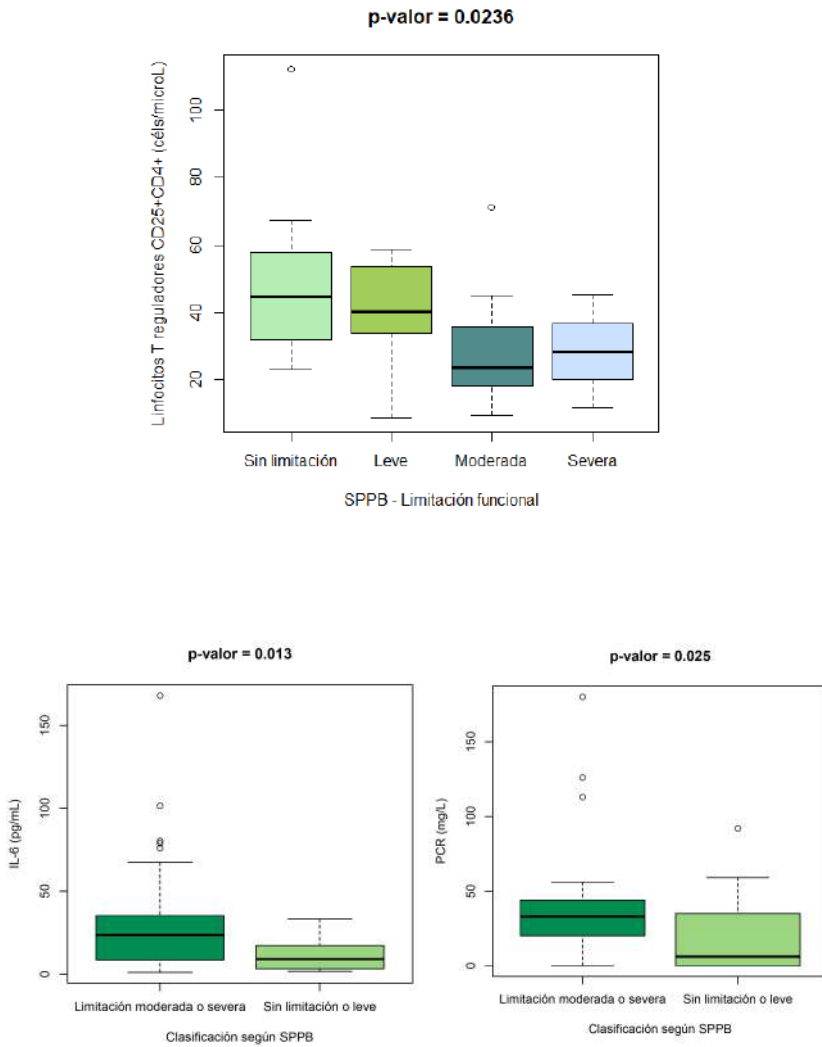


Figura 45-F. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de linfocitos CD4⁺ reguladores (arriba), IL-6 (abajo izquierda) y PCR (abajo derecha) en función de la valoración por la escala SPPB. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

Finalmente, sólo la clasificación por la escala SIOG1 fue capaz de detectar diferencias significativas en las poblaciones celulares. Los pacientes *fit* presentan valores absolutos más elevados de linfocitos $\gamma\delta$ $V\delta 1^+V\delta 2^+$ respecto a los pacientes vulnerables y frágiles. En cuanto a los pacientes muy frágiles, no se encontraron diferencias significativas, pero sólo se pudo incluir un paciente en este subgrupo (figura 45-E).

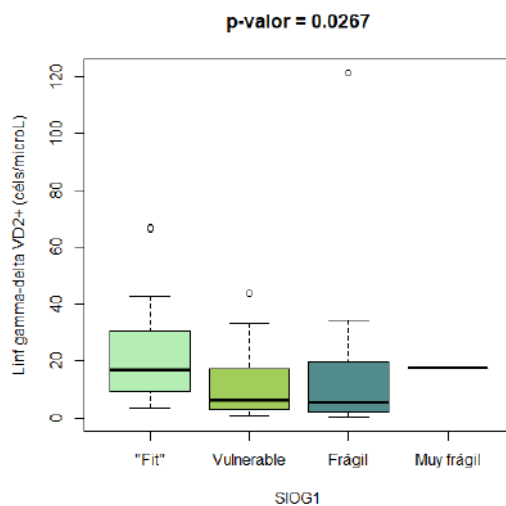


Figura 45-G. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de linfocitos $\gamma\delta$ $V\delta 2^+V\delta 1^+$ en función de la valoración por la escala SIOG1. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

4.2.2. Relación bivalente entre variables analíticas y con la edad

En la figura 46 se muestran las variables analíticas nutricionales, inflamatorias y del hemograma y linfocitarias básicas así como la edad. Las variables con relación directa se

representan coloreadas en azul (más oscuro cuanto mayor es esta relación). Por el contrario, las variables inversamente relacionadas, se representan de color marrón (también en este caso, cuanto mayor es la relación inversa, más oscuro es el color del gráfico).

El número que se observa en cada casilla corresponde al coeficiente de correlación de Spearman expresado en porcentaje. En los siguientes apartados, se desarrollan dichas correlaciones encontradas.

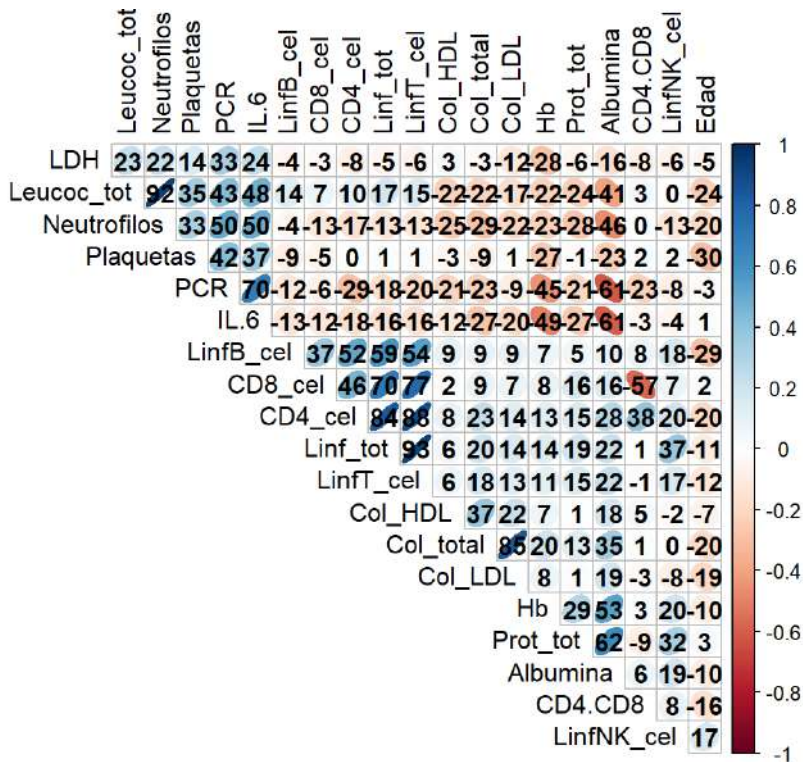


Figura 46. Gráfico que muestra la correlación de Spearman (coeficiente expresado en porcentaje) entre las variables analíticas y la edad.

4.2.2.1. Relación entre variables analíticas nutricionales e inflamatorias

En cuanto a las variables nutricionales, destaca la albúmina, que se relaciona de forma inversa con PCR e IL-6. Por el contrario, niveles altos de LDH asocian también niveles elevados de PCR e IL-6 (aunque dicha correlación es débil).

4.2.2.2. Relación entre variables analíticas nutricionales y hematológicas inmunológicas

Respecto a su relación con parámetros celulares, la albúmina se relaciona también de forma inversa con el nivel de leucocitos totales y neutrófilos, mientras que su relación es positiva con el nivel de hemoglobina y el recuento de linfocitos (especialmente T, aunque con una correlación débil).

4.2.2.3. Relación entre variables analíticas inflamatorias bioquímicas y celulares

Hallamos también que las variables linfocitarias están íntimamente relacionadas entre sí. Además, PCR e IL-6 (parámetros inflamatorios bioquímicos) tienen relación directa con los leucocitos totales, neutrófilos y plaquetas (variables inflamatorias celulares). No obstante, su relación es inversa con los linfocitos T, especialmente los linfocitos CD4⁺, aunque no se encontró correlación con subpoblaciones linfocitarias específicas ni con las células dendríticas.

4.2.2.4. Relación entre poblaciones linfocitarias entre sí y con la edad

En la figura 47 muestra una tendencia a la relación inversa entre la edad y el recuento de linfocitos B. Esto también ocurre con el porcentaje de linfocitos B. Opuestamente, el porcentaje de linfocitos NK parece aumentar con la edad. De todos modos, en todos estos casos, aún siendo estadísticamente significativos, el coeficiente de correlación es muy bajo como para establecer una relación clara con la edad.

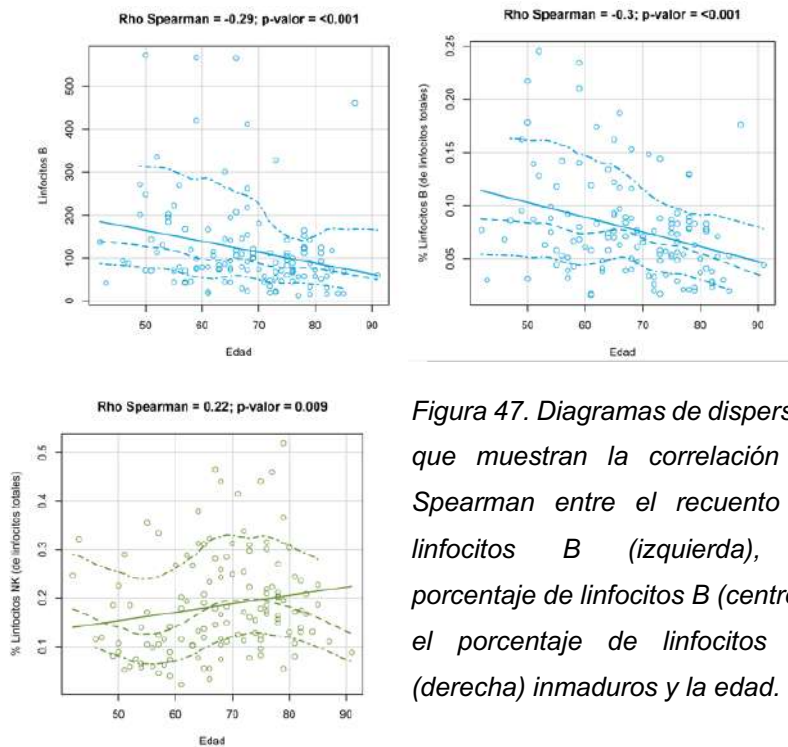


Figura 47. Diagramas de dispersión que muestran la correlación de Spearman entre el recuento de linfocitos B (izquierda), el porcentaje de linfocitos B (centro) y el porcentaje de linfocitos NK (derecha) inmaduros y la edad.

En el título del gráfico se incluye el coeficiente y p-valor del test Rho de Spearman.

Por último, se estudió la posible correlación entre cada una de las variables linfocitarias específicas entre sí y la edad (considerada como variable continua); tanto de su recuento linfocitario (figura 48-A), como de su porcentaje (48-B).

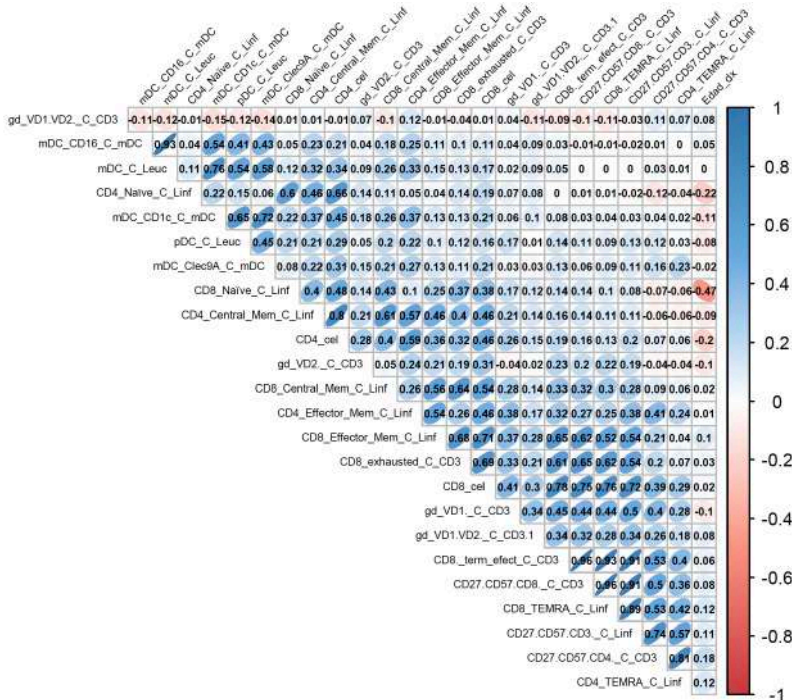


Figura 48-A. Gráfico que muestra la correlación de Spearman entre los valores absolutos de las poblaciones linfocitarias específicas y la edad.

Cabe destacar que las poblaciones linfocitarias de células maduras CD8⁺ (CD27⁻CD57⁺, TEMRA, exhaustas y con diferenciación terminal) se relacionan de forma directa entre sí, pero su correlación con las células maduras CD4⁺ fue generalmente baja (0.53 – 0.26). En cambio, la correlación fue algo mayor (moderada, coeficiente = 0.6) entre la presencia de

células inmaduras (*naïve*) de ambos subtipos. Los niveles de células dendríticas sólo se correlacionaron entre sí. Por último, en cuanto a la edad, sólo se observó un grado de correlación negativa débil (aunque estadísticamente significativa) con los niveles de linfocitos CD8⁺ inmaduros (coeficiente = -0.47); en cuanto a los niveles de CD4⁺ *naïve*, la correlación negativa, aunque el p-valor obtenido fue estadísticamente significativo, era escasa (coeficiente -0.22) y por tanto, no puede considerarse clínicamente ni estadísticamente relevante, y tampoco podemos extraer conclusiones definitivas al respecto.

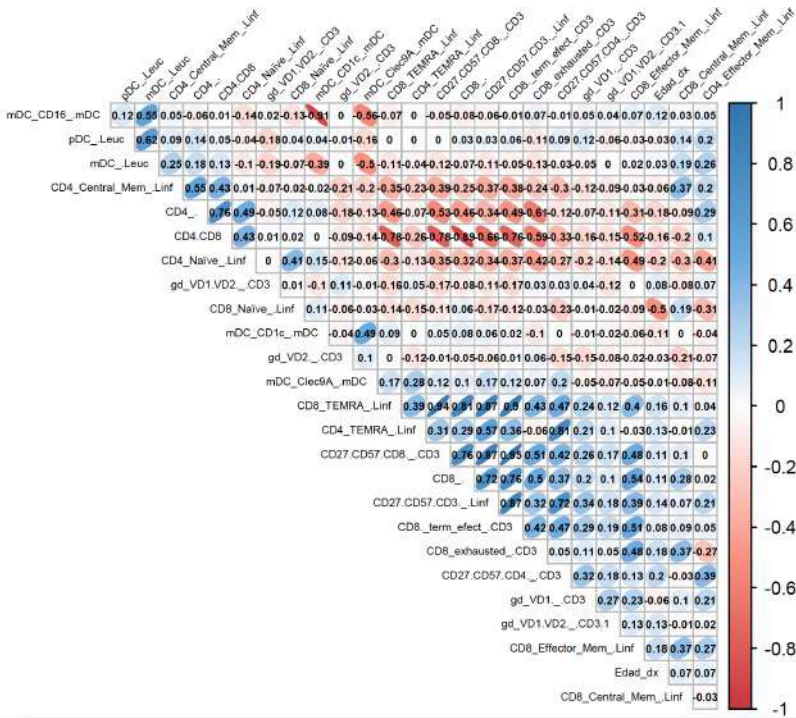


Figura 48-B. Gráfico que muestra la correlación de Spearman entre los porcentajes de las poblaciones linfocitarias específicas y la edad.

Los datos descritos para los recuentos linfocitarios, son prácticamente superponibles a los de los valores relativos (porcentajes), con una correlación discreta-moderada que no nos permite sacar conclusiones definitivas. Como es lógico en este caso, sí se observa una correlación inversa entre los porcentajes de linfocitos CD4⁺ y subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺, pero cabe destacar, que esto es sobre todo relevante en el caso de linfocitos CD4⁺ *naïve* y centrales de memoria, frente a linfocitos CD8⁺ más maduros (efectores de memoria, TEMRA, exhaustos o con diferenciación terminal).

Finalmente, se estudió la correlación con los linfocitos T reguladores, que no mostró variación clínicamente significativa con la edad (coeficiente de Spearman = -0.1 a -0.18) por lo que no se adjunta el gráfico. El estudio de correlaciones entre los linfocitos *naïve* y la edad, se muestra gráficamente a continuación.

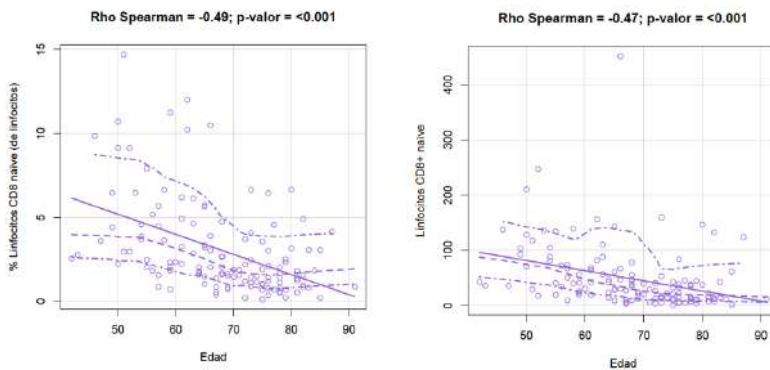


Figura 49-A. Diagramas de dispersión que muestran el estudio de la correlación mediante el test de Spearman entre linfocitos CD8⁺ inmaduros y la edad. En el título del gráfico se incluye el coeficiente y p-valor del test Rho de Spearman.

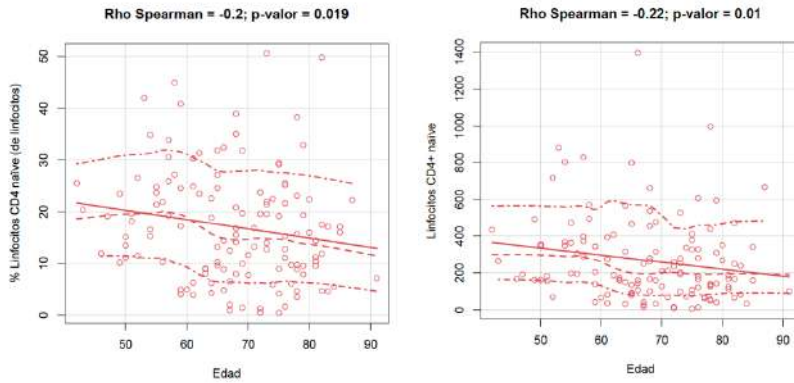


Figura 49-B. Diagramas de dispersión que muestran el estudio de la correlación mediante el test de Spearman entre linfocitos CD4⁺ inmaduros y la edad. En el título del gráfico se incluye el coeficiente y p-valor del test Rho de Spearman.

4.2.2.5. Relación entre poblaciones linfocitarias y la infección por CMV

La exposición a CMV (determinada por la presencia de IgG de CMV) se relacionó en esta muestra con niveles más altos de todos las subpoblaciones linfocitarias maduras, exhaustas y con diferenciación terminal, tanto en valores absolutos como relativos. En concreto, en el subgrupo de linfocitos CD4⁺ con los niveles de linfocitos EM (p-valor = 0.034) y TEMRA (p-valor <0.001) (figura 50-A).

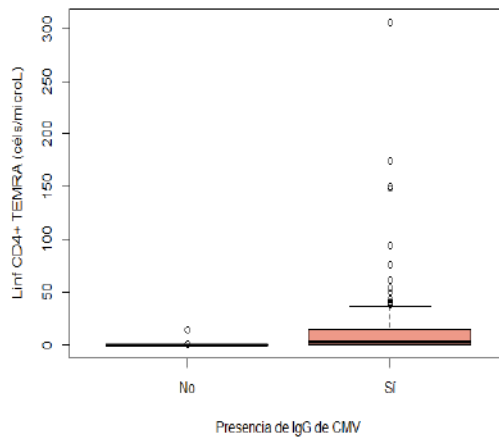
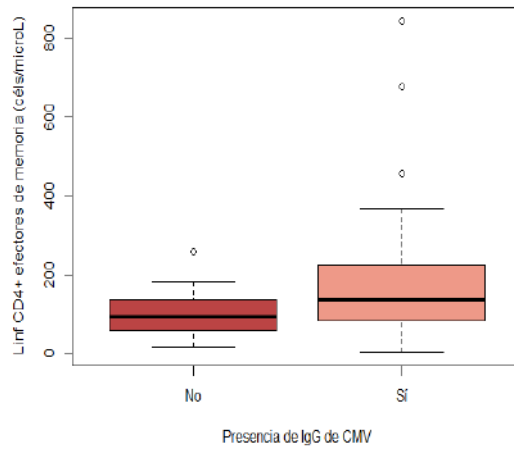


Figura 50-A. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de linfocitos CD4⁺ EM (arriba) y TEMRA (abajo) en función de la presencia de IgG de CMV (estadísticamente significativo mediante el test Kruskal-Wallis).

También la presencia de anticuerpos IgG contra CMV se correlacionó con los valores de linfocitos CD8⁺ EM (p-valor 0.011), efectores terminales (p-valor <0.001), exhaustos (p-valor 0.049) y TEMRA (p-valor <0.001), e incluso con los niveles de linfocitos CD8⁺ totales (p-valor <0.001). Por otro lado, estos pacientes presentaron ratios CD4⁺/CD8⁺ más bajas, debido precisamente a los valores elevados de linfocitos CD8⁺. Se muestran algunos ejemplos en la figura 50-B.

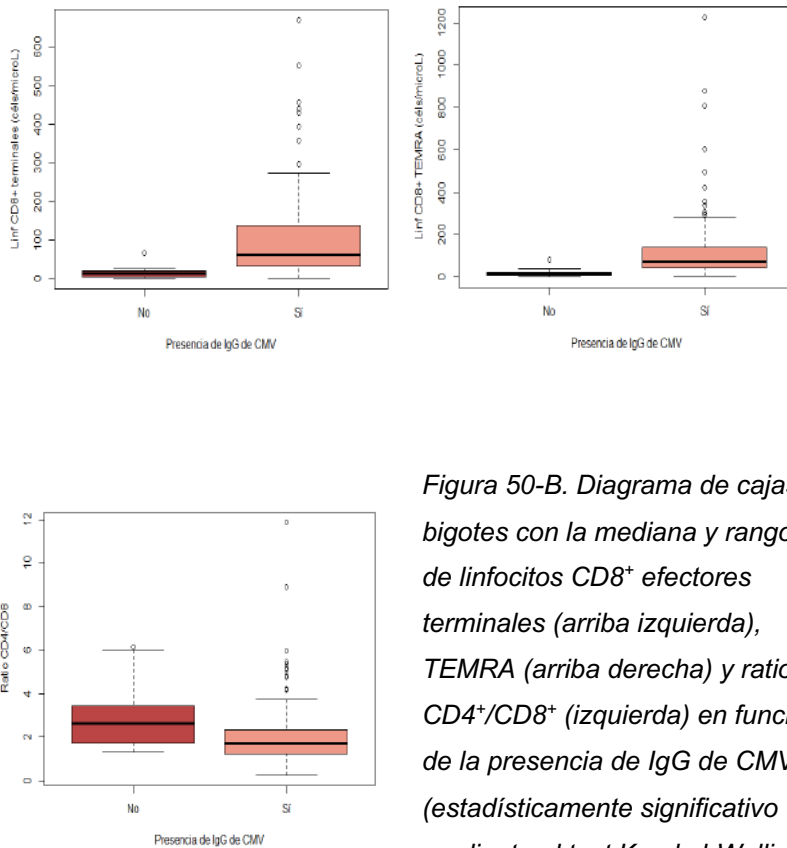


Figura 50-B. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de linfocitos CD8⁺ efectores terminales (arriba izquierda), TEMRA (arriba derecha) y ratio CD4⁺/CD8⁺ (izquierda) en función de la presencia de IgG de CMV (estadísticamente significativo mediante el test Kruskal-Wallis).

Por último, la exposición a CMV se asoció en el presente estudio con niveles más bajos de linfocitos NK (p-valor = 0.033) y también a valores más altos de linfocitos T $\gamma\delta$ $V\delta 1^+V\delta 2^-$ (p-valor 0.013).

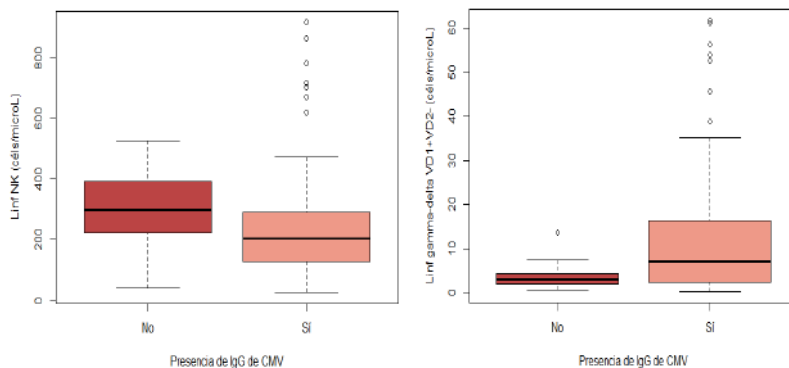


Figura 50-C. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de linfocitos NK (izquierda) y $\gamma\delta$ $V\delta 2^-V\delta 1^+$ (derecha) en función de la presencia de IgG de CMV (estadísticamente significativo mediante el test Kruskal-Wallis).

4.2.3. Relación multivariante entre variables clínicas y analíticas: análisis de componentes principales (PCA)

Tras el estudio de las relaciones bivariantes entre las variables incluidas en el trabajo de investigación se decidió efectuar un análisis multivariable. Debido al elevado número de variables así como la elevada correlación entre muchas de ellas se consideró que el modo más eficiente de realizar este análisis consistía en emplear un modelo multivariante de

reducción de la dimensión como es el análisis de componentes principales (PCA).

Para generar el modelo PCA se incluyeron todos los parámetros inmunológicos e inflamatorios, y el resto de variables clínicas o demográficas se emplearon como información auxiliar para interpretar los resultados del PCA. Las poblaciones linfocitarias se determinaron tanto en porcentaje como en número de células por microlitro, y el análisis de PCA se realizó en ambos casos por separado.

El PCA crea nuevas variables, que resultan de la combinación lineal de las variables originales, denominadas componentes principales (*dimensions (Dim)* en los gráficos que se muestran a continuación). Este número reducido de nuevas variables, permite explicar gran parte de la variabilidad de los datos originales.

4.2.3.1. Población global

En el caso de la población global, las 4 primeras componentes principales explicaron el 60.3% de la variabilidad de los datos (30.9, 13.4, 9.4 y 6.6%, respectivamente) (figura 51).

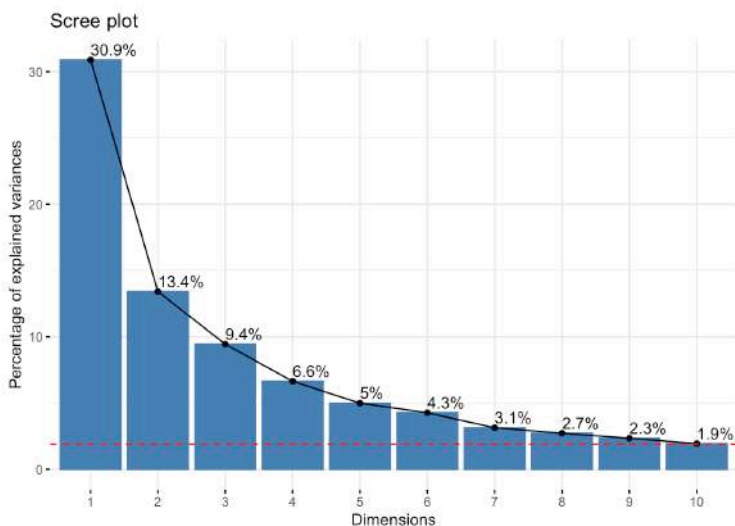


Figura 51. Gráfico PCA para la muestra global. Las barras y puntos muestran el porcentaje de varianza explicada por cada componente principal.

A continuación, se estudiaron los casos cuyas poblaciones celulares y parámetros analíticos inflamatorios distaran mucho del modelo (considerados *outliers*). Se encontraron 5 pacientes, que no compartían entre sí características clínicas, demográficas ni relacionadas con el tumor. En cuanto a sus poblaciones linfocitarias diferenciales:

El paciente 33 destacaba en cuanto a sus linfocitos poco diferenciados ($CD3^+CD45RA^+CCR7^+$, así como $CD8^+$ y $CD4^+naïve$). Por el contrario, el caso 52, presentaba elevado número de linfocitos $CD8^+$, sobre todo efectores de memoria, exhaustos y con diferenciación terminal; también el paciente 260 presentaba un perfil similar. En cambio, el paciente 60 se

caracterizó por elevada presencia de linfocitos CD4⁺ maduros y la subpoblación CD8⁺CD4⁺. No se consideró eliminar estos casos del análisis puesto que las distintas poblaciones por las que destacaba cada paciente estaban interrelacionadas fisiológicamente entre sí, además de que estaban también presentes en otros casos.

No obstante, el paciente 163 destacaba exclusivamente por una alta presencia de linfocitos T $\gamma\delta$ VD1⁺VD2⁺, cuya representación era bajísima o nula en todos los pacientes restantes y, dado que podría tratarse de un error en la determinación, se decidió eliminar este paciente del análisis.

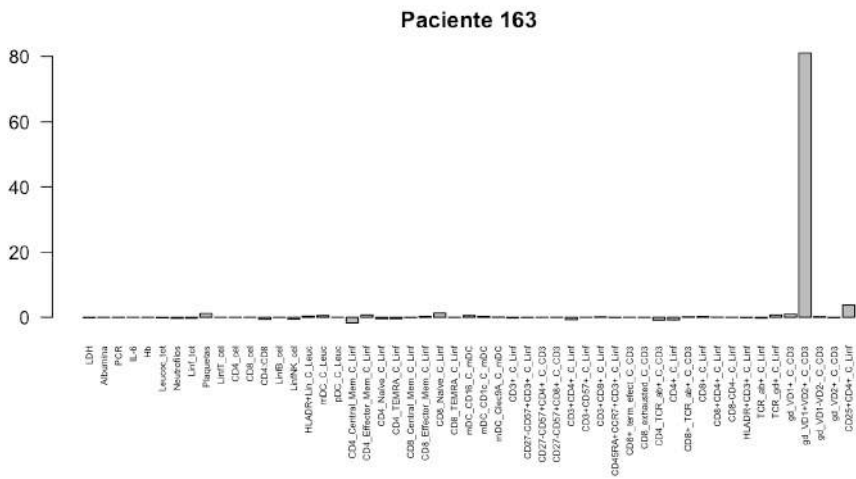


Figura 52. Gráfico de contribución de cada variable al valor anómalo del paciente 163 en su distancia al modelo PCA.

De nuevo, se seleccionaron 4 componentes principales (PCs) que explicaban un 60.12% del total de variabilidad en los datos. A continuación se muestran los gráficos de *loadings* con las variables que más contribuyen a la formación de las componentes principales (figuras 53), un gráfico de correlación de Pearson de dichas variables con las componentes principales (figura 54) y, por último, los gráficos de *scores* con los pacientes coloreados con variables no incluidas en el PCA y que podrían servir para interpretar mejor el modelo obtenido (figuras 55-58).

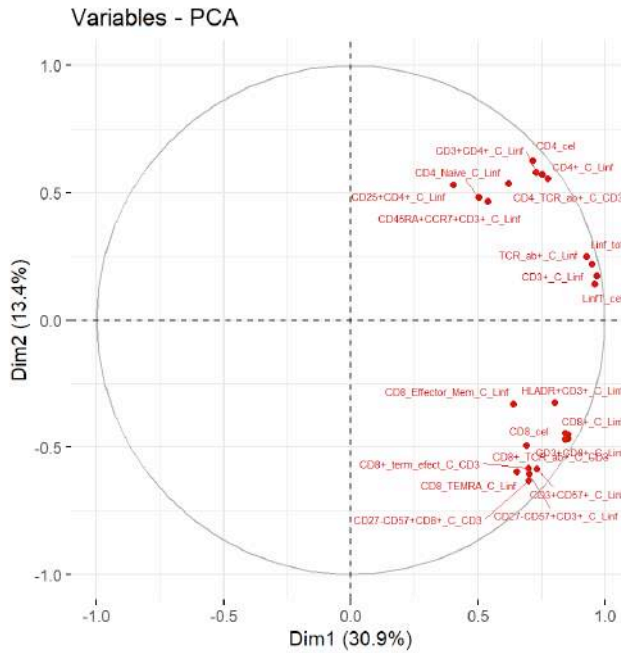


Figura 53-A. Modelo de análisis de componentes principales con las variables representadas mediante vectores en función de su contribución a las dos primeras componentes en el grupo global.

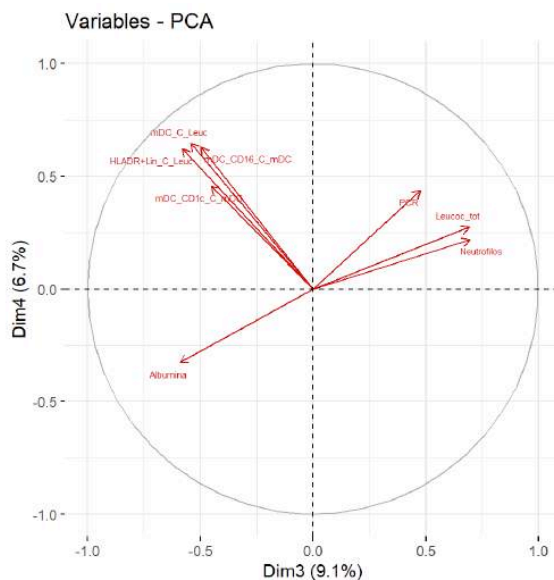


Figura 53-B. Modelo de análisis de componentes principales con las variables representadas mediante vectores en función de su contribución a 3ª y 4ª componentes en el grupo global.

La figura 53-A muestra las variables que contribuyen en mayor medida a las componentes 1 y 2 (Dim1 y Dim2); y la 53-B las que tienen más peso en Dim3 y Dim4. Solo se muestran las variables que más han contribuido. Podemos decir además, que las variables que están en el mismo cuadrante están directamente relacionadas; las que se encuentran en cuadrantes opuestos están inversamente relacionadas; el resto no se relacionan entre sí.

Por tanto, observamos que el nivel de linfocitos totales está relacionado tanto con el valor de los linfocitos T, y a su vez, con subpoblaciones de linfocitos T $\alpha\beta$, y en concreto linfocitos CD4⁺

y algunas de sus subpoblaciones (linfocitos CD4⁺ naïve y reguladores). Por otro lado (y sin correlación con las poblaciones previas) se relacionan directamente entre sí los linfocitos CD8⁺, sobre todo las células más diferenciadas (efectores de memoria, exhaustos, con diferenciación terminal, TEMRA y CD27-CD57⁺, principalmente). Dicha correlación puede observarse más claramente en la figura 54, que se muestra a continuación.

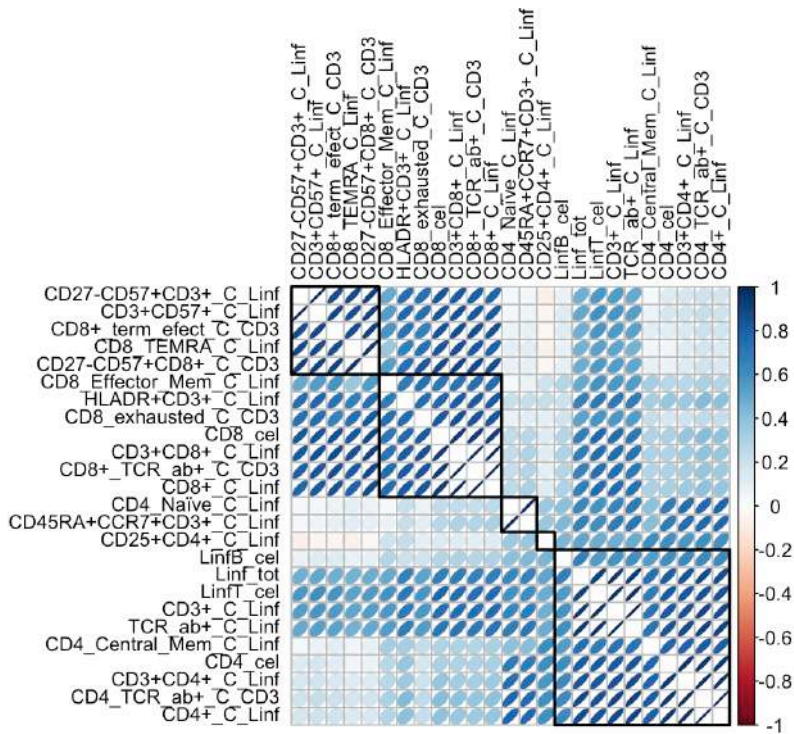


Figura 54. Gráfico que muestra la correlación de Pearson entre las variables linfocitarias más relevantes en el modelo PCA para los componentes Dim1 y Dim2.

Por otro lado, las variables que más contribuyeron a Dim3 y Dim4 fueron; por un lado, leucocitos, neutrófilos, PCR (directamente relacionadas entre sí), y la albúmina que se correlacionó con estas variables de forma negativa; y, por otro lado, las células dendríticas y sus subpoblaciones de células dendríticas mieloides o convencionales.

Con estos modelos, podemos representar a cada uno de los pacientes en estos gráficos de dos dimensiones en función de los valores de estas variables. Si además de esto, coloreamos a cada paciente situado en el gráfico según alguna característica no incluida en el modelo PCA, nos permite discernir si existe alguna agrupación en función de características clínicas de los pacientes. Para esto, se han empleado variables demográficas, nutricionales, de valoración funcional y relacionadas con el tumor para colorear a los pacientes. Aunque este proceso se ha realizado para todas estas variables, sólo se muestran los gráficos que han resultado más relevantes.

En primer lugar, se realizó el estudio con las variables ECOG y edad categorizada (jóvenes <70 años vs. ancianos \geq 70 años) por separado, sin observarse predominio de ningún grupo de pacientes en alguno de los cuadrantes del gráfico. Por esto, se decidió agrupar a los pacientes en función de ambas variables.

En la figura 55 se muestran los pacientes coloreados en función de los grupos de edad y ECOG conjuntamente, de modo que, los pacientes del grupo I son pacientes jóvenes con buena situación funcional; los del grupo II, pacientes ancianos con ECOG conservado (0-1); los casos del grupo III, paciente

jóvenes, con situación funcional deteriorada; y los del grupo IV, ancianos con mala situación funcional según la escala ECOG (2-4). En este caso, tampoco observamos correlación con ninguno de estos subgrupos, ya que los pacientes clasificados, se encontraban distribuidos en los cuatro cuadrantes en ambos gráficos.

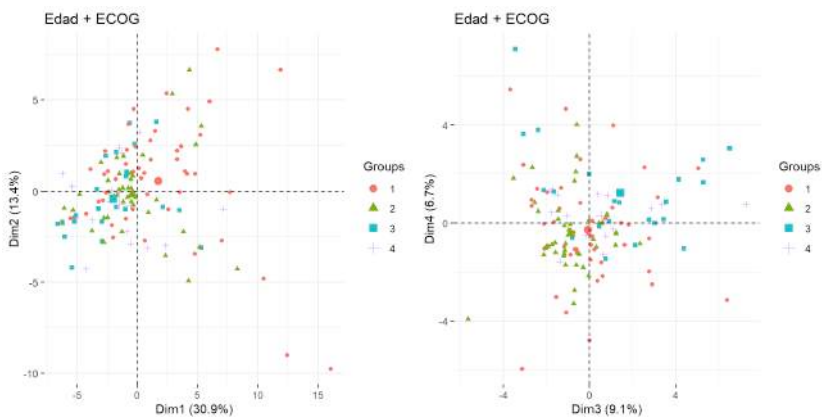


Figura 55. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes coloreados en función de la variable edad categorizada + ECOG, para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 – Dim4 (derecha). Leyenda: grupo I = ECOG 0-1 + edad <70 años; grupo II = ECOG 0-1 + edad ≥70 años; grupo III = ECOG 3-4 + edad <70 años; grupo IV = ECOG 3-4 + edad ≥70 años.

La situación funcional fue evaluada con la clasificación de caquexia – precaquexia – situación normal, así como mediante el test MNA. Ninguno de los dos casos mostró relación con las componentes Dim1-4. Se muestra como ejemplo la representación de situación nutricional en la figura 56-A y el

resultado de la valoración con MNA (figura 56-B). El único hallazgo relevante es que prácticamente ningún paciente con situación nutricional normal se situó en el cuadrante superior derecho del gráfico para la 3ª y 4ª componentes principales, lo cual indica que casi ninguno de estos pacientes presentaba neutrofilia, elevación de PCR e hipoalbuminemia.

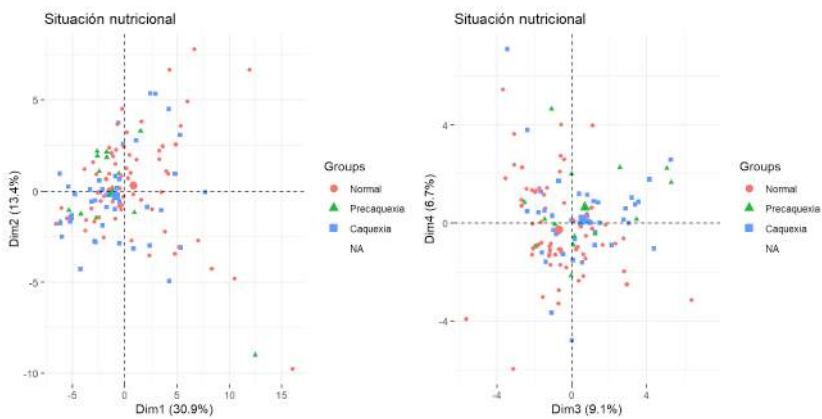


Figura 56-A. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes coloreados en función de la variable situación nutricional (alterado o normal), para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 y Dim4 (derecha).

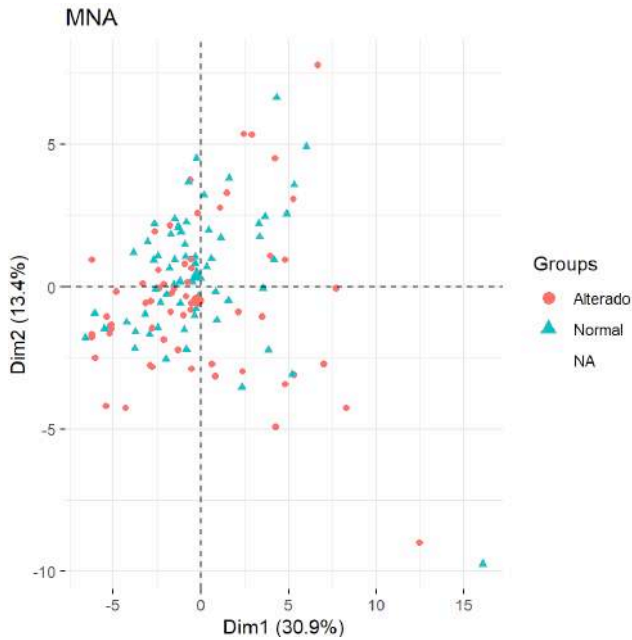


Figura 56-B. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes coloreados en función de la variable MNA (alterado o normal), para los componentes Dim1 y Dim2.

En cuanto a las variables relativas al tumor, tanto el estadio como la expresión de PD-L1 en el tumor, se mostraron independientes a las componentes principales estudiadas. Con la única excepción de los pacientes con estadio II, que se situaron en el gráfico que incluye las componentes Dim3 y Dim4 de forma predominante en el cuadrante superior izquierdo, mostrando su relación con niveles más elevados de células dendríticas mieloides así como de sus dos subtipos principales: CD1c⁺ y CD16⁺.

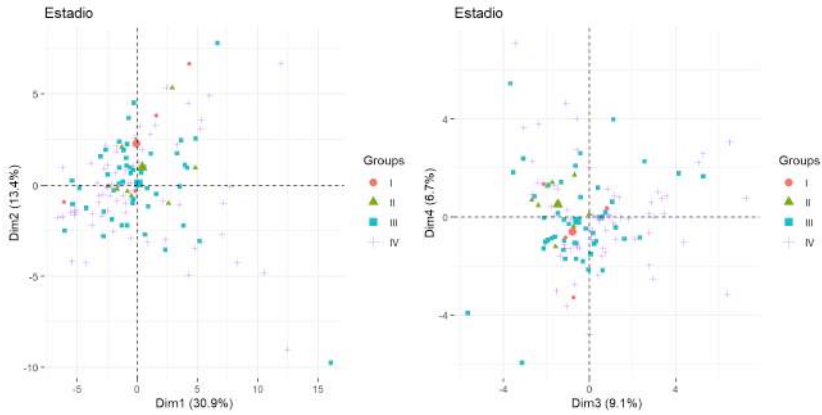


Figura 57-A. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes coloreados en función de la variable estadio, para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 – Dim4 (derecha).

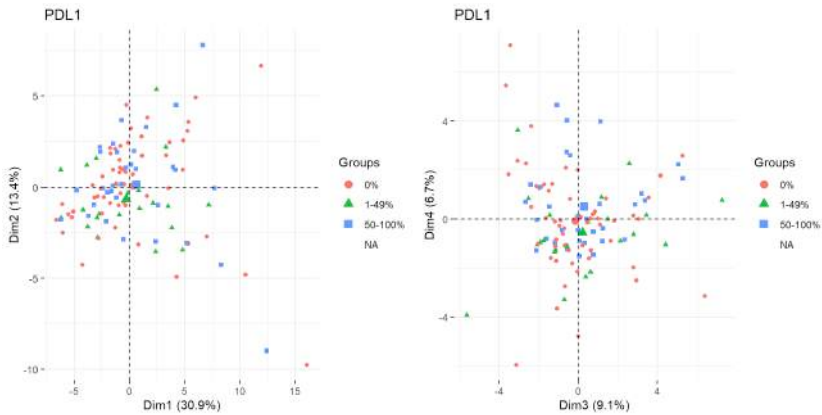


Figura 57-B. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes coloreados en función de la variable expresión de PD-L1, para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 – Dim4 (derecha).

Para finalizar, se muestra en la figura 58 los pacientes coloreados en función de la exposición previa a CMV. En este caso, sí se observa que los pacientes que no han sufrido infección por CMV se sitúan predominantemente en el cuadrante superior izquierdo del gráfico; por lo que estos pacientes tienden a presentar niveles más bajos de linfocitos CD8⁺, fundamentalmente de las células más diferenciadas (efectores de memoria, exhaustos, con diferenciación terminal, TEMRA y CD27⁻CD57⁺).

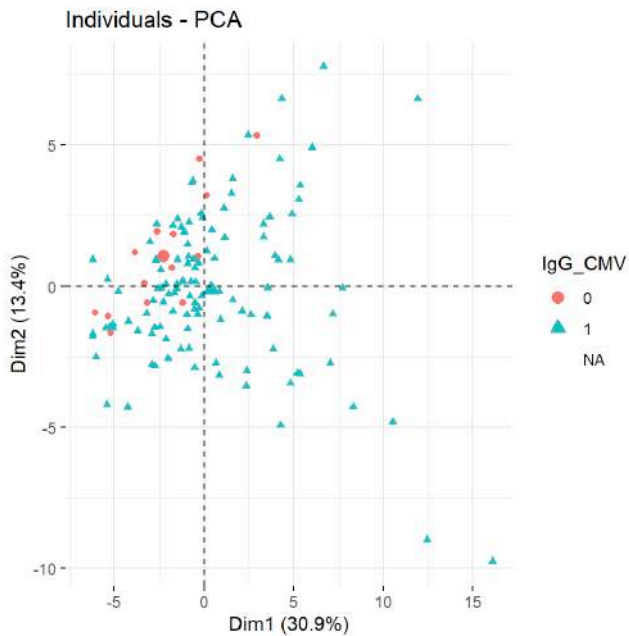


Figura 58. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes coloreados en función de la variable presencia de anticuerpos IgG contra CMV, para los componentes Dim1 y Dim2. Leyenda: 0 = no; 1 = sí.

Este mismo análisis se realizó para los valores relativos (%) de las poblaciones linfocitarias. Obtuvimos del mismo modo, 4 componentes principales que explican el 60.12% de variabilidad del modelo. Pero dado que estos hallazgos son prácticamente superponibles a los valores absolutos mostrados previamente, y no aportan mayor información en cuanto a la correlación entre variables clínicas y linfocitarias, se decidió no incluirlos.

4.2.3.2. Población anciana

En el caso de la población de 70 años o más, las 4 primeras componentes principales explican el 61.7% de la variabilidad de los datos (en la figura 59 se observa el peso específico de cada componente).

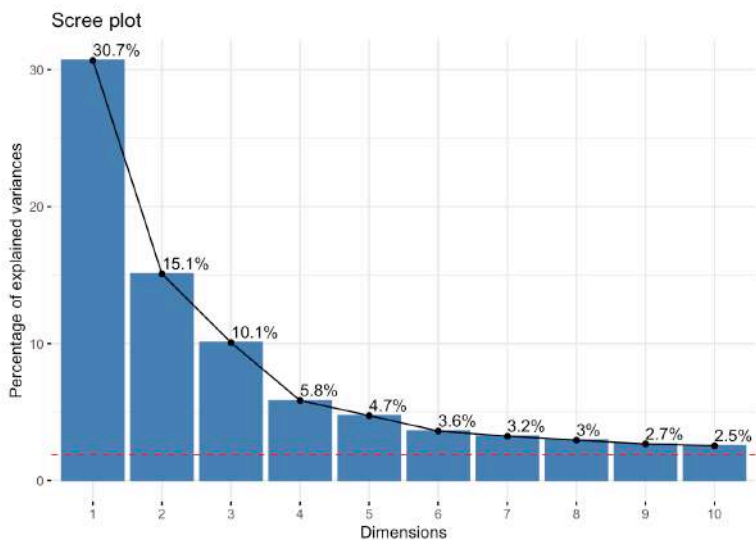


Figura 59. Gráfico PCA para la población anciana. Las barras y puntos muestran el porcentaje de varianza explicada por cada componente principal.

En este modelo sólo dos pacientes fueron considerados *outliers* (60 y 193). El paciente 190 se caracterizaba por presencia de mayores niveles de neutrófilos, linfocitos B y linfocitos T $\gamma\delta$ V δ 1 $^{-}$ V δ 2 $^{+}$. Ambos pacientes se mantuvieron en el análisis final.

De modo análogo a lo descrito en la población global, se creó el modelo PCA con los 4 componentes (figura 60).

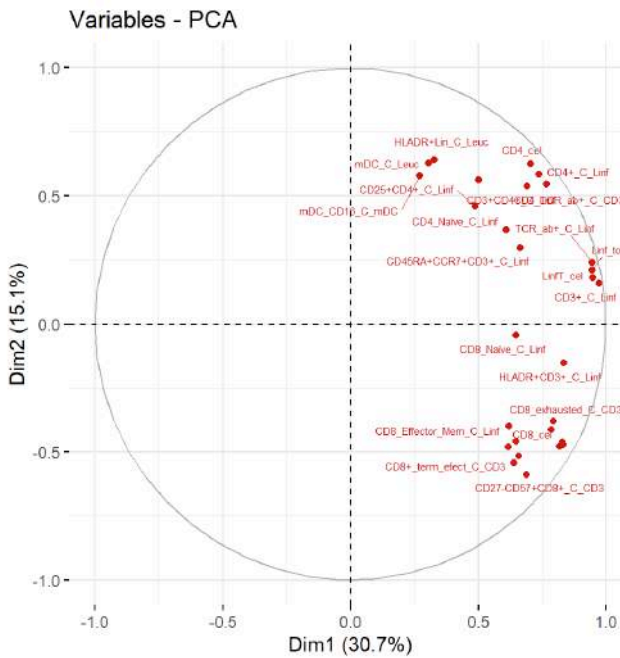


Figura 60-A. Modelo de análisis de componentes principales con las variables representadas mediante vectores en función de su contribución a las dos primeras componentes principales en el grupo de pacientes ancianos.

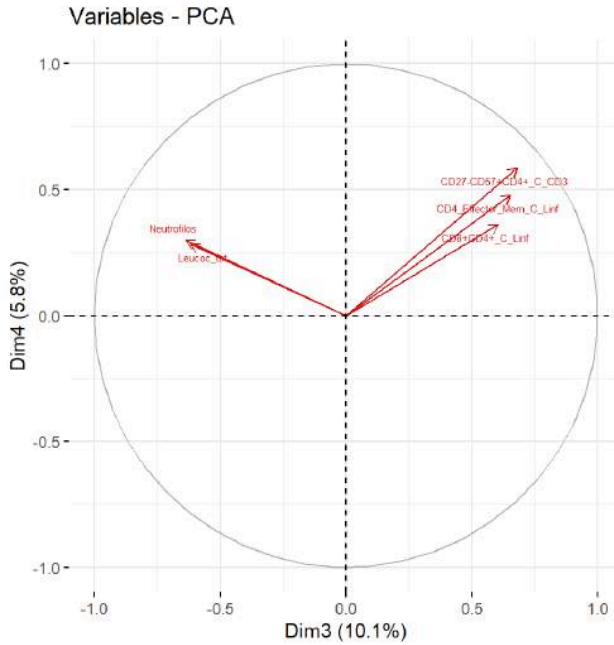


Figura 60-B. Modelo de análisis de componentes principales con las variables representadas mediante vectores en función de su contribución a la 3ª y 4ª componentes principales en el grupo de pacientes ancianos.

En este caso, las variables que definieron Dim1 y Dim2 fueron, por un lado (arriba a la derecha): linfocitos T, y también la población CD4⁺, fundamentalmente inmaduros y *naïve*, así como reguladores. En ese mismo cuadrante encontramos también directamente relacionadas las poblaciones de células dendríticas, y en concreto mieloides y de entre éstas, la subpoblación CD16⁺. En otro cuadrante, sin relación con las anteriores (cuadrante inferior a la derecha), linfocitos T maduros (CD27-CD57⁺) así como CD8⁺, representados por casi todas sus

poblaciones: *naïve*, efectores de memoria, maduros, con diferenciación terminal, TEMRA y exhaustos (abajo a la derecha).

Para los componentes Dim3 y Dim4, las variables de mayor peso son neutrófilos y leucocitos (coincidiendo con el grupo global de la muestra); y por otro lado, y relacionadas entre sí linfocitos T CD4⁺ inmaduros y efectores de memoria junto con la población doblemente positiva CD8⁺CD4⁺. Esto se muestra también mediante las correlaciones de Pearson de la figura 61.

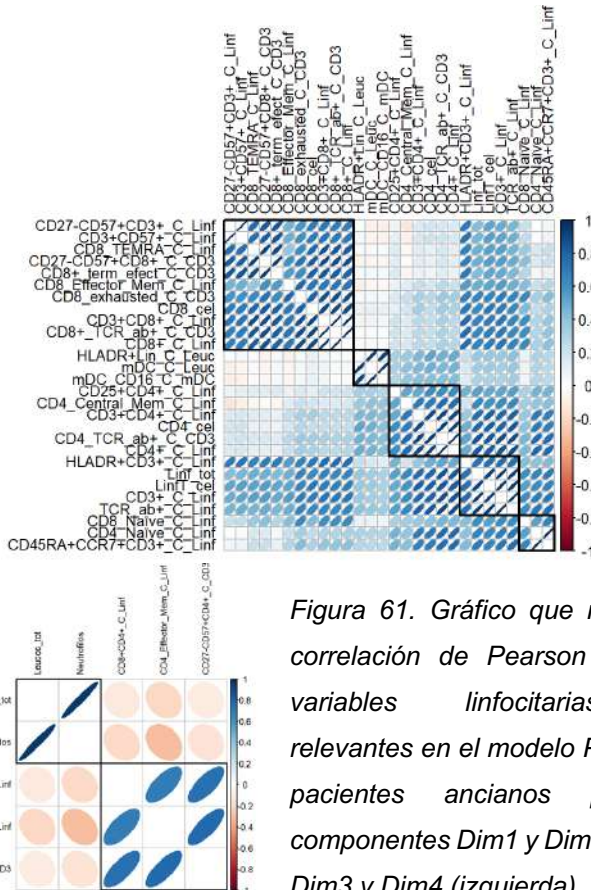


Figura 61. Gráfico que muestra la correlación de Pearson entre las variables linfocitarias más relevantes en el modelo PCA en los pacientes ancianos para los componentes Dim1 y Dim2 (arriba) y Dim3 y Dim4 (izquierda).

En este subgrupo de pacientes, representamos también cada caso en estos gráficos de dos dimensiones en función de sus valores de estas variables, coloreados en función alguna característica no incluida en el modelo PCA. De nuevo en este caso, sólo se muestran los gráficos que han resultado más relevantes.

Tal y como ocurría en la población global, en los pacientes de 70 años o más, no encontramos agrupación de los pacientes en los gráficos en función del sexo, del ECOG, de las características del tumor o de las variables nutricionales, lo cual, ya se había observado en el grupo global.

Pasamos a analizar por tanto, las características clínicas estudiadas mediante la valoración geriátrica integral. Respecto a las actividades básicas de la vida diaria (medidas mediante el test de Barthel) y las instrumentales (con el test de Lawton-Brody), no encontramos agrupación de los pacientes en cuanto a las características de su sistema inmunológico (figuras 62 y 63).

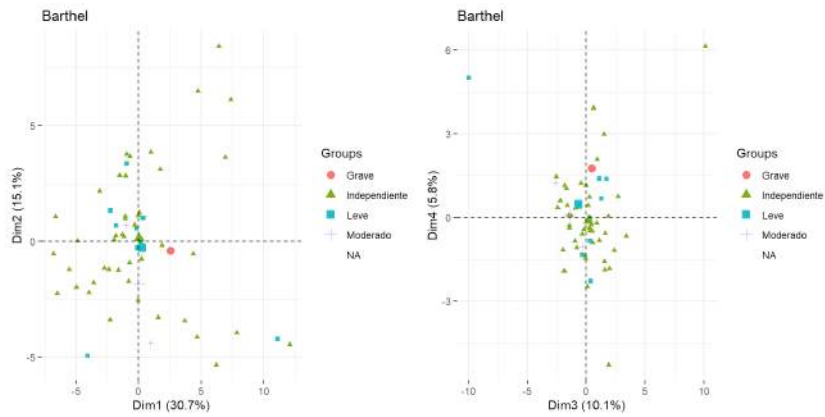


Figura 62. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes ancianos coloreados en función de la clasificación mediante el test de Barthel, para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 y Dim4 (derecha).

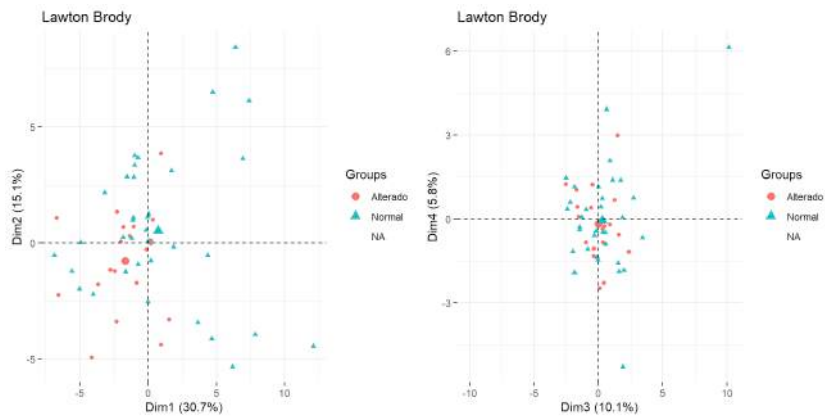


Figura 63. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes ancianos coloreados en función de la clasificación mediante el test de Lawton-Brody, para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 y Dim4 (derecha).

En cuanto a la evaluación de la función cognitiva, no encontramos relación en función de la puntuación en el test de Pfeiffer (figura 64-A), no obstante, los pacientes con situación cognitiva alterada en función del mini-mental test de Lobo, sí se situaron predominantemente en el cuadrante superior izquierdo en el caso de las variables Dim1 y Dim2; y en el inferior derecho en la representación de Dim3 y Dim4 (figura 64-B). Estos pacientes tienen por tanto niveles más bajos de las subpoblaciones de linfocitos CD8⁺ así como de neutrófilos.

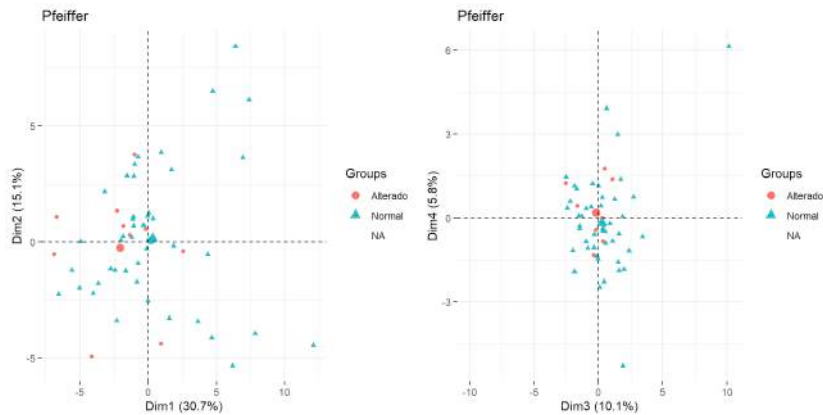


Figura 64-A. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes ancianos coloreados en función de la clasificación del test de Pfeiffer, para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 y Dim4 (derecha).

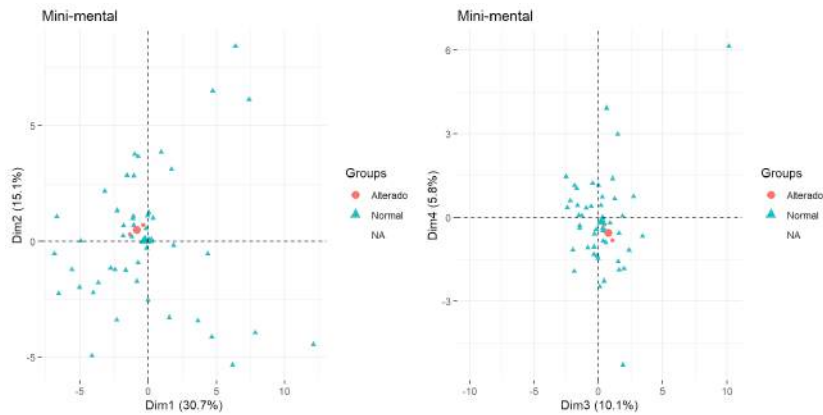


Figura 64-B. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes ancianos coloreados en función de la clasificación del mini-mental test de Lobo, para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 y Dim4 (derecha).

En la evaluación social, así como en la valoración emocional mediante los tests de ansiedad-depresión o el cuestionario de Yesavage no se encontró relación con las componentes principales estudiadas. Se muestra como ejemplo la clasificación mediante el cuestionario de Gijón (figura 65). Aunque los pacientes con situación social deteriorada parecen situarse predominantemente en el cuadrante superior izquierdo del gráfico para las componentes Dim1 y Dim2 (mostrando una posible relación con niveles más bajos de los subtipos de linfocitos CD8⁺) también hay pacientes situados en el cuadrante superior derecho e inferior izquierdo.

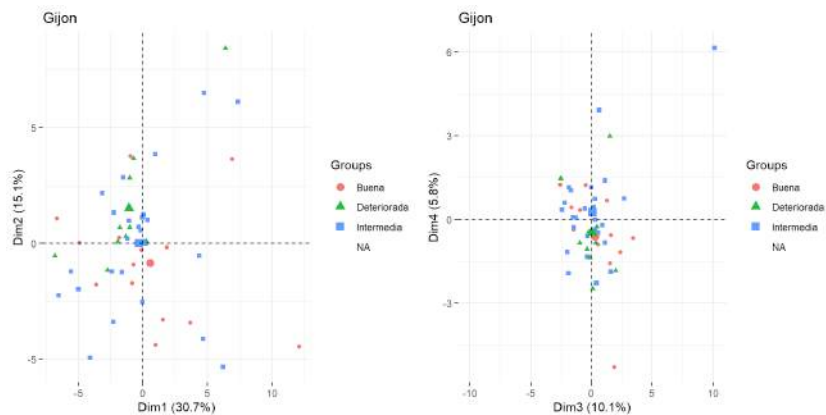


Figura 65. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes ancianos coloreados en función de la clasificación del cuestionario de Gijón, para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 y Dim4 (derecha).

La presencia de síndromes geriátricos o la clasificación geriátrica tampoco situaron a los pacientes en ninguna región predominante de los gráficos (y por tanto, no se correlacionaron con características del sistema inmunológico), como se observa por ejemplo en la figura 66 (presencia de caídas, como síndrome geriátrico) y en la 67 (con los pacientes coloreados en función de la clasificación de SIOG1).

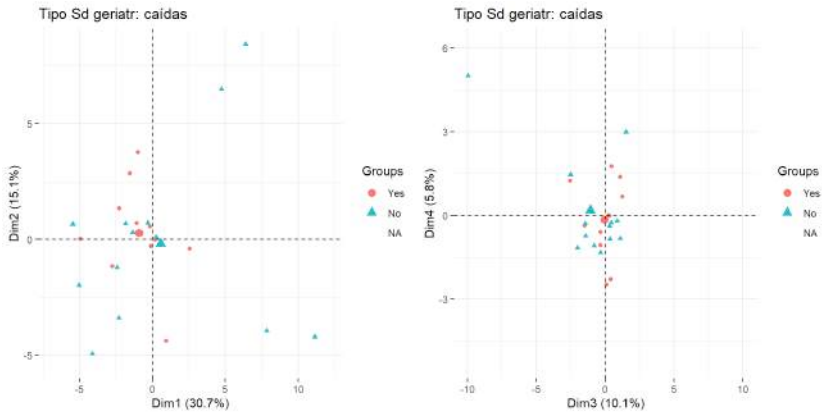


Figura 66. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes ancianos coloreados en función de la presencia o no de caídas en los últimos 6 meses, para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 y Dim4 (derecha). Leyenda: Yes = sí; No = no.

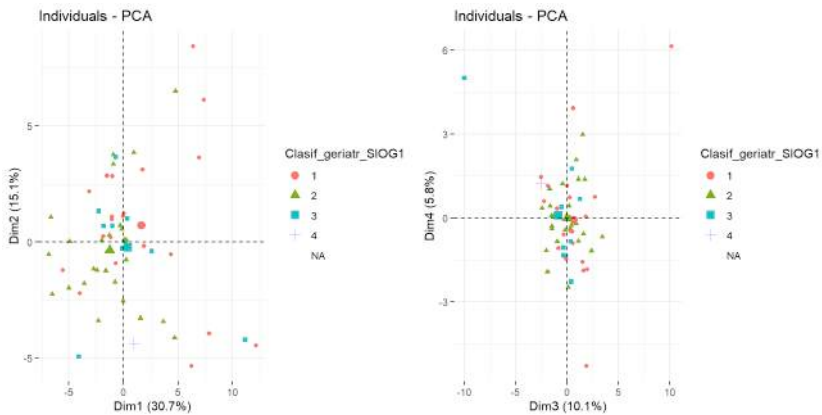


Figura 67. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes ancianos coloreados en función de clasificación geriátrica SIOG1, para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 y Dim4 (derecha). Leyenda: 1 = “fit”; 2 = vulnerable; 3 = frágil; 4 = “muy frágil”.

4.2.3.3. Pacientes en los que se analizaron las subpoblaciones de linfocitos T reguladores

Para finalizar, realizó el mismo análisis en los 46 pacientes en los que se pudieron determinar los subtipos de linfocitos T reguladores. Se seleccionan también 4 componentes principales. Éstas explican un 60.21% del total de la variabilidad de los datos.

En este caso, no se aprecian casos anómalos importantes, por lo que no se considera excluir ningún paciente.

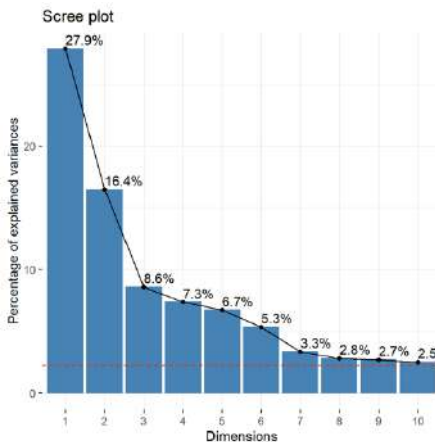


Figura 68. Gráfico PCA para los casos en los que se estudiaron las subpoblaciones de linfocitos CD4⁺ T reguladores. Las barras y puntos muestran el porcentaje de varianza explicada por cada componente principal.

En la figura de *loadings* se observa que las subpoblaciones de linfocitos T reguladores se sitúan en el cuadrante superior derecho del gráfico que contiene las dos primeras componentes principales (figura 69). Por tanto, se correlacionan directamente entre ellas; pero además, se relacionan también de forma directa

con los linfocitos B, los linfocitos CD4⁺ así como con los CD4⁺ naïve y centrales de memoria.

En este mismo gráfico, se correlacionan de forma directa entre sí las poblaciones de linfocitos CD8⁺ totales con sus subpoblaciones TEMRA y maduras, de modo similar a lo que se observa en el grupo global de la muestra.

En cuanto a las variables que tienen mayor peso en la 3^a y 4^a componentes principales, encontramos prácticamente las mismas a las observadas previamente: las poblaciones de células dendríticas, directamente relacionadas entre sí; y la albúmina, sin relación con las anteriores.

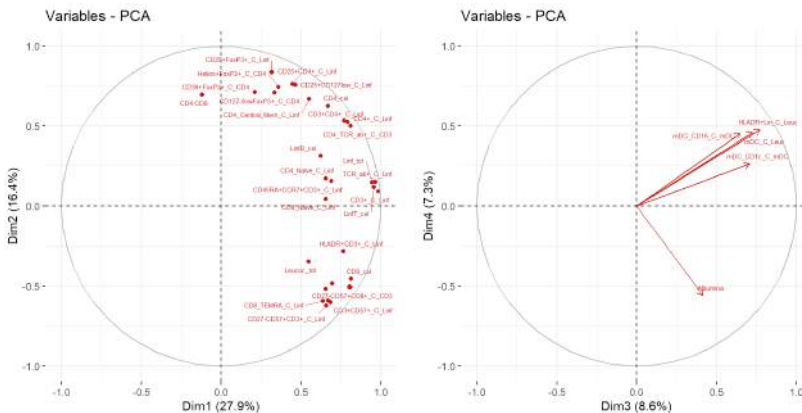


Figura 69. Modelo de análisis de componentes principales con las variables representadas mediante vectores en función de su contribución a las dos primeras componentes principales (izquierda) y a la 3^a y 4^a componentes principales (derecha) en el grupo de pacientes en los que se estudiaron las subpoblaciones de linfocitos CD4⁺ T reguladores.

Al colorear a los pacientes en función de las variables clínicas de modo análogo a lo descrito previamente, no encontramos ninguna señal de relación entre éstas y los parámetros representados en el modelo, salvo en el caso de la infección por CMV. De todos modos, esto no ofrece ninguna diferencia respecto a lo descrito para la población global (figura 70), de modo que no parece que la ausencia o presencia de anticuerpos IgG contra CMV tenga relación con las subpoblaciones de linfocitos CD4⁺ (incluyendo los T reguladores), mientras que sí tiene impacto en las subpoblaciones de linfocitos CD8⁺.

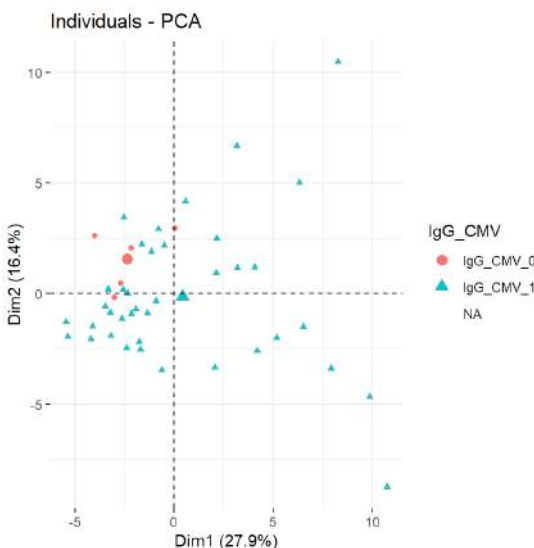


Figura 70. Gráfico de scores del análisis de PCA con los pacientes coloreados en función de la presencia de anticuerpos IgG contra CMV, para los componentes Dim1 y Dim2. Leyenda: 0 = no; 1 = sí.

4.2.4. Estudio específico de la relación entre la edad y los puntos de corte de variables linfocitarias

La edad se ha considerado el factor principal en el análisis de la inmunosenescencia. Por nuestra parte, encontramos previamente en la imagen 36 que la edad analizada como variable continua se relaciona de forma negativa con los niveles de leucocitos, neutrófilos, plaquetas y linfocitos B. No obstante, no pudimos hallar correlación con las subpoblaciones de linfocitos T.

Con estos hallazgos como punto de partida, buscamos el punto de corte de edad óptimo que nos permitiera maximizar la discrepancia entre las medias en el recuento y porcentaje de cada una de las poblaciones linfocitarias entre los dos grupos de edad definidos por dicho punto de corte. Como estadísticos de discrepancia se emplearon el test de contraste t-Student y el test no paramétrico de Wilcoxon. En la tabla 5 se muestran los más relevantes y el corte de edad determinado con el test de Wilcoxon.

Tabla 5. Punto de corte óptimo para la edad en diferentes poblaciones celulares.

	Recuento absoluto	Recuento relativo (%)
Linfocitos T totales	71**	65**
Linfocitos B	71	69
Linfocitos NK	67**	67**

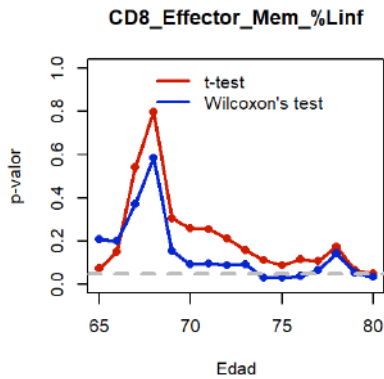
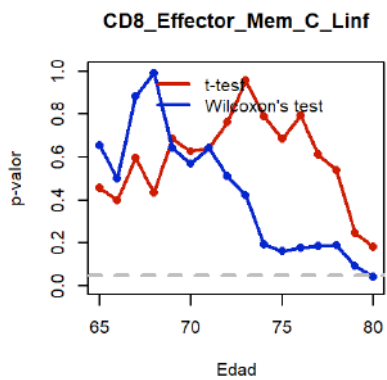
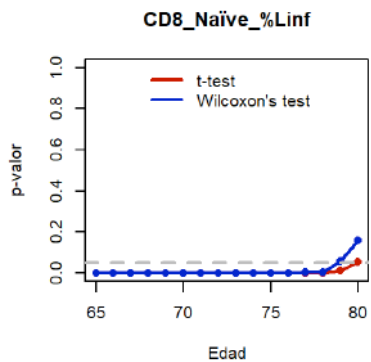
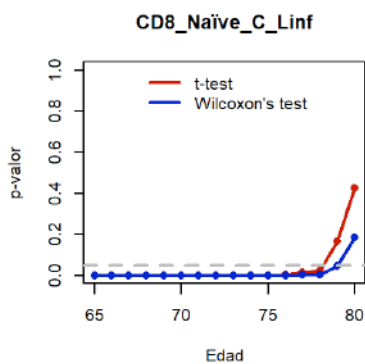
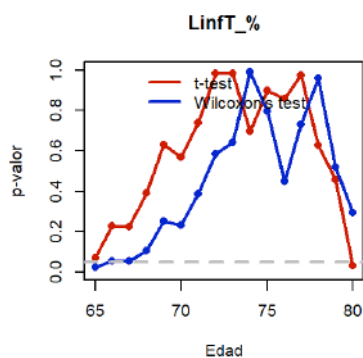
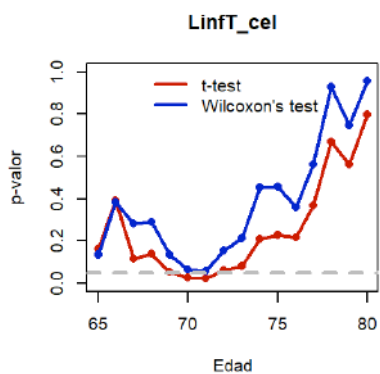
	Recuento absoluto	Recuento relativo (%)
Linfocitos T CD8 ⁺	80	80
Linfocitos T CD8 ⁺ <i>naïve</i>	67**	67**
Linfocitos T CD8 ⁺ <i>central memory</i>	80	76
Linfocitos T CD8 ⁺ <i>effector memory</i>	80**	75**
Linfocitos T CD8 ⁺ TEMRA	80	68
Linfocitos T CD8 ⁺ efectores terminales	80	80
Linfocitos T CD8 ⁺ exhaustos	80	70**
Linfocitos T CD4 ⁺	71**	66**
Linfocitos T CD4 ⁺ <i>naïve</i>	65**	66
Linfocitos T CD4 ⁺ <i>central memory</i>	71	65
Linfocitos T CD4 ⁺ <i>effector memory</i>	78	74
Linfocitos T CD4 ⁺ TEMRA	65**	65**
Linfocitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺ (reguladores)	65**	66**
Linfocitos T TCR αβ	71	67**
Linfocitos T TCR γδ	68	65
Linfocitos T TCR γδ Vδ1 ⁺ Vδ2 ⁻	68**	68**
Linfocitos T TCR γδ Vδ1 ⁺ Vδ2 ⁺	76**	76**
Linfocitos T TCR γδ Vδ1 ⁻ Vδ2 ⁻	80**	80**

	Recuento absoluto	Recuento relativo (%)
Linfocitos T TCR $\gamma\delta$ $V\delta 1-V\delta 2^+$	76	80

Leyenda: los puntos de corte obtenidos con el test de Wilcoxon que definen dos grupos de edad con diferencias significativas entre las medianas de las poblaciones linfocitarias se marcan con **.

A rasgos generales, observamos puntos de corte de edad distintos para cada población, no obstante, sí que puede identificarse que, en el caso de los linfocitos T $CD8^+$ el punto de corte es más alto para la mayoría de subpoblaciones (alrededor de 75-80, salvo en los linfocitos inmaduros, que es de 67), si lo comparamos con los puntos de corte de los linfocitos T $CD4^+$, que está en torno a 65 años para la mayoría de subpoblaciones (excepto en el subtipo *effector memory*). En el caso de las células dendríticas y de los linfocitos $\gamma\delta$, el corte de edad difería para cada una de las subpoblaciones, por lo que no se muestran en el análisis.

No obstante, aunque se definieron estos puntos de corte, no con todos ellos se encontraron diferencias entre los grupos que definían de forma estadísticamente significativa (estos se han señalado en la tabla 5 y se muestran algunos en la figura 71, a continuación).



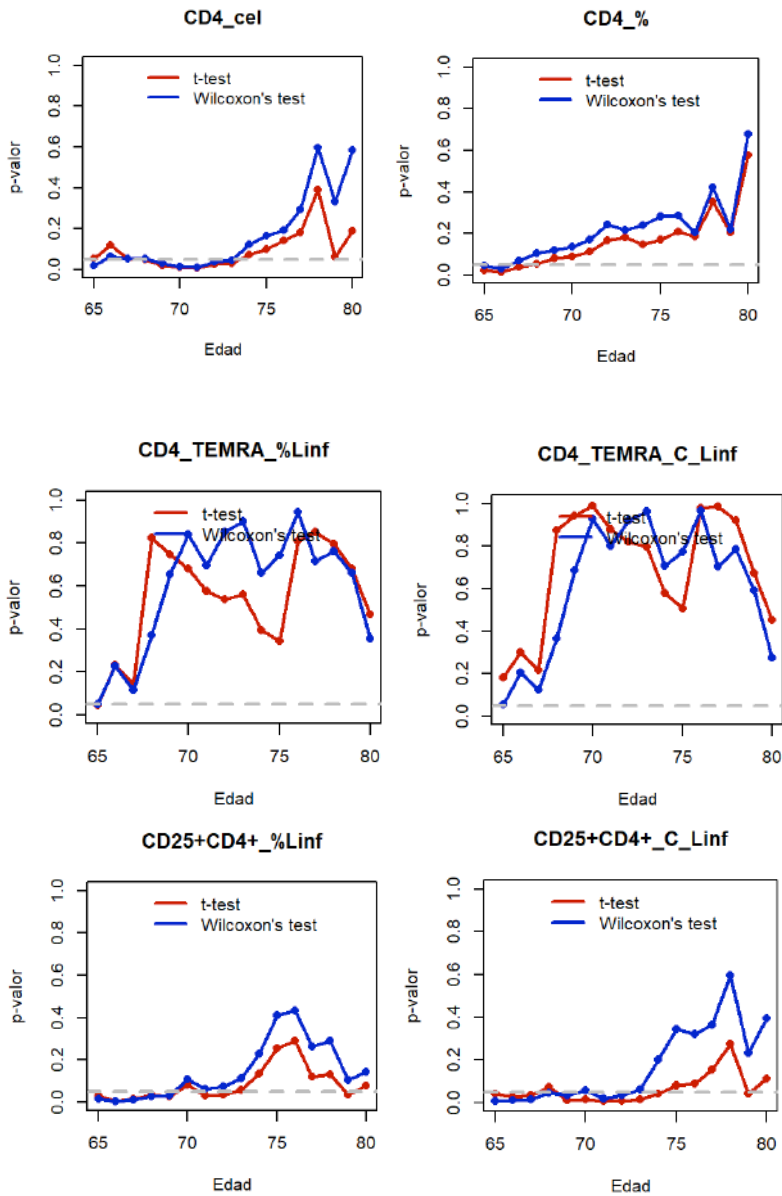


Figura 71. Representación mediante gráficos de puntos del valor de p para la diferencia de media/mediana del recuento linfocitario de distintas subpoblaciones para los dos grupos de individuos (jóvenes-ancianos) creados con cada punto de edad, obtenido mediante el test t -Student (rojo) y test de Wilcoxon (azul).

4.3. Agrupación de los pacientes en función de las características del sistema inmunológico: “clustering”

Se aplicaron técnicas estadísticas de *clustering* para la obtención de diferentes grupos de pacientes con patrones inmunológicos diferentes. Para ello, en primer lugar se dividieron las variables en dos grupos: clínicas e inmunes.

Las variables clínicas incluían parámetros demográficos, características físicas, comorbilidad de los pacientes así como su situación funcional y valoración emocional, nutricional, social y geriátrica (en los casos indicados), y también características propias del tumor.

En cuanto al grupo de variables inmunológicas, se incorporaron las variables hematológicas básicas, todas las poblaciones linfocitarias, así como de células dendríticas.

La metodología de *clustering* se aplicó sobre las variables inmunológicas expresadas en número absoluto tras estandarización de las mismas (es decir, tras escalarlas y centrarlas). En primer lugar, se estudió la tendencia de agrupamiento de los datos mediante el estadístico de Hopkins, que toma valores entre 0 y 1. Este coeficiente resultó ser de 0.78, por lo que se concluyó que había grupos en los datos analizados y se decidió proseguir con el análisis *clustering*.

Con esta metodología, se obtuvo el número óptimo de *clusters* o grupos con perfiles inmunológicos similares de nuestra muestra, que fue un total de 9 grupos (*clusters* 0-8).

4.3.1. "Clustering"

Los patrones inmunitarios medios obtenidos para cada *cluster* se muestran en las figuras 72-80. La línea discontinua naranja señala el 0, ya que las medias de cada población linfocitaria se han escalado para toda la muestra. Por tanto, los puntos negros representan la media de cada población celular para ese *cluster*, y permiten determinar si dicho valor se encuentra por encima o por debajo de la media de toda la muestra. No obstante, sólo se describirán a continuación, los valores cuyo coeficiente obtenido mediante el modelo PLS-DA ha resultado significativo.

El *cluster* 0 (n = 10) se caracterizó por tener niveles elevados del compartimento de células CD8⁺ a expensas de los linfocitos maduros, efectores terminales, exhaustos y TEMRA.

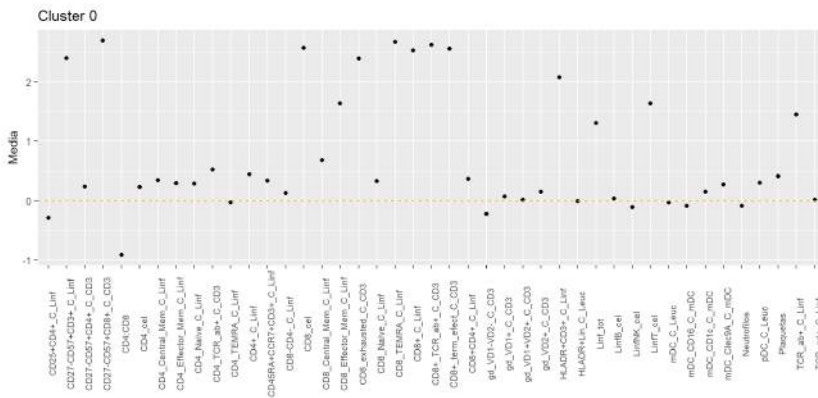


Figura 72. Diagrama de puntos con la representación de las medianas y rangos para los valores de cada población linfocitaria del "cluster" 0.

El grupo 1 (n = 13), presentaba un predominio de linfocitos T $\gamma\delta$ respecto al resto, sobre todo VD1⁺VD2⁻; también los niveles de T CD4⁺ EM, CM, reguladores, CD4⁻CD8⁻ eran algo mayores, así como los linfocitos B.

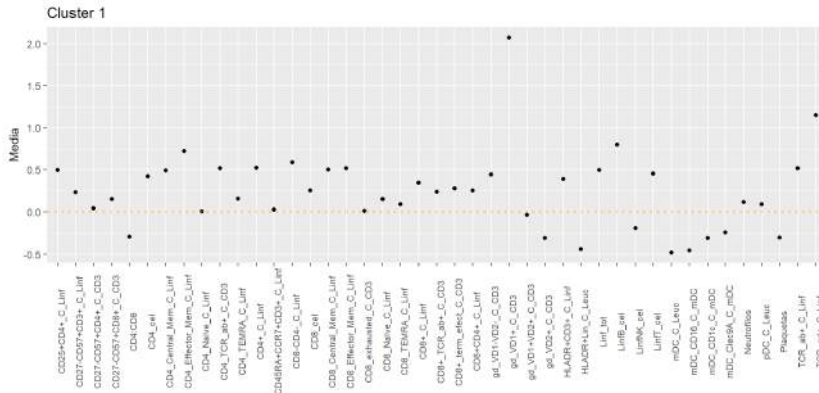


Figura 73. Diagrama de puntos con la representación de las medianas y rangos para los valores de cada población linfocitaria del "cluster" 1.

El 2 (n = 32), no se define por ningún grupo celular predominante, pero sí presentó valores ligeramente superiores de linfocitos T $\gamma\delta$ VD1⁺VD2⁻, y discretamente menores de linfocitos CD4⁺, en concreto de la población *naïve*.

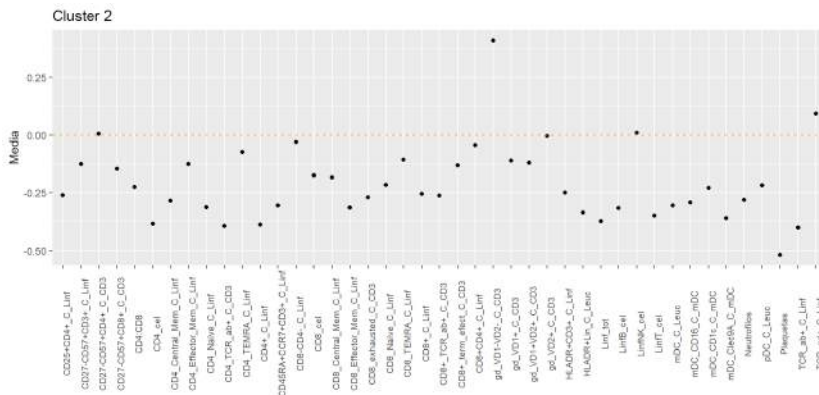


Figura 74. Diagrama de puntos con la representación de las medianas y rangos para los valores de cada población linfocitaria del “cluster” 2.

El cluster 3 (n = 7) se definía por una ratio elevada de linfocitos CD4/CD8, lo que muestra una presencia prominente de los linfocitos CD4 fundamentalmente inmaduros y centrales de memoria.

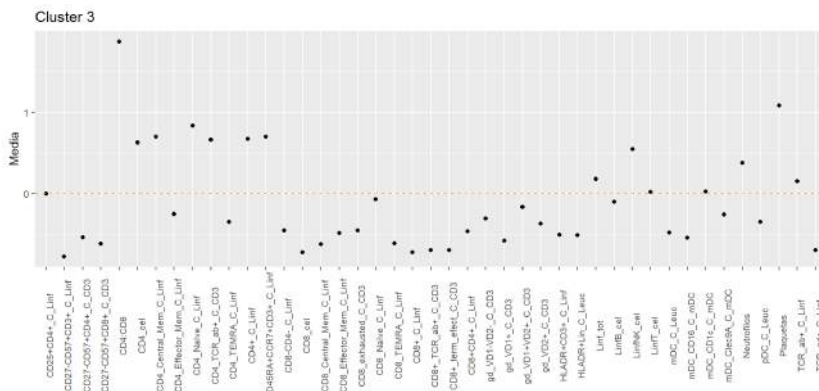


Figura 75. Diagrama de puntos con la representación de las medianas y rangos para los valores de cada población linfocitaria del “cluster” 3.

De forma llamativa, el grupo 4 (n = 17), mostró valores más elevados de células dendríticas, incluyendo todos sus subtipos (plasmocíticas y convencionales).

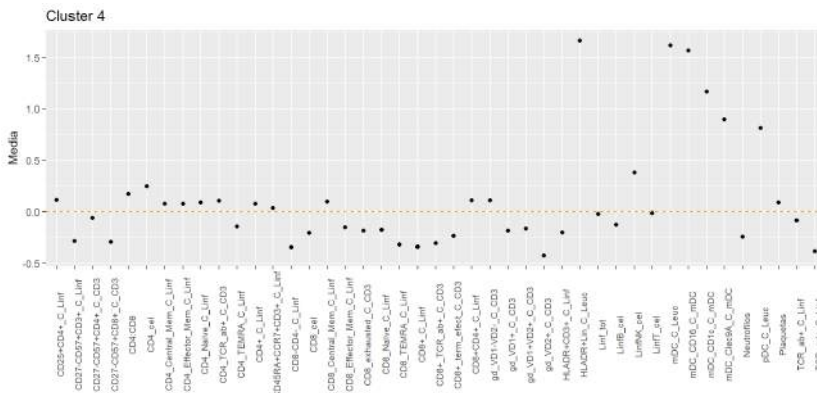


Figura 76. Diagrama de puntos con la representación de las medianas y rangos para los valores de cada población linfocitaria del “cluster” 4.

Por otro lado, el 5 (n = 21) se distinguía por un recuento elevado de células T reguladoras, linfocitos T CM y *naïve* sobre todo del subtipo CD4⁺, pero también de la subpoblación CD8⁺. Este grupo se asociaba también a mayores niveles de linfocitos T γδ (principalmente VD1⁺VD2⁺).

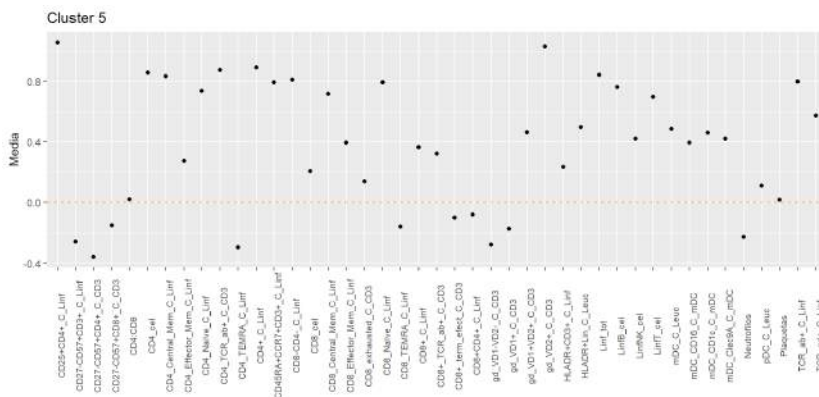


Figura 77. Diagrama de puntos con la representación de las medianas y rangos para los valores de cada población linfocitaria del "cluster" 5.

En cambio, el *cluster* 6 (n = 4) se definía claramente por la presencia de linfopenia, que afectaba prácticamente a todas las subpoblaciones linfocitarias, así como por la presencia de neutrofilia y trombofilia.

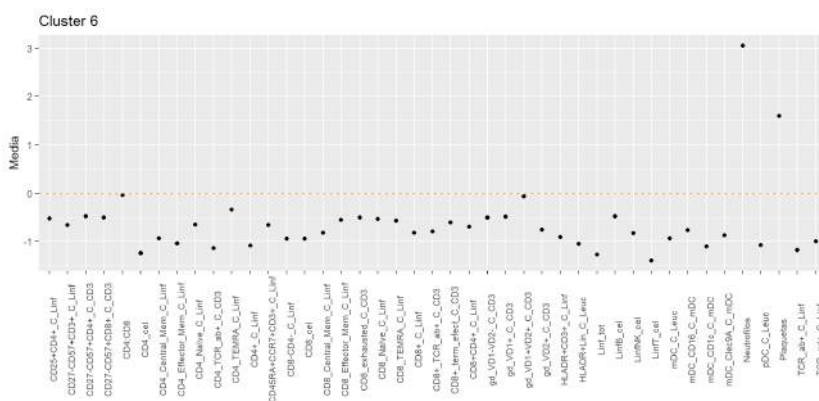


Figura 78. Diagrama de puntos con la representación de las medianas y rangos para los valores de cada población linfocitaria del "cluster" 6.

Los pacientes del grupo 7 (n = 20) también mostraron linfopenia (sobre todo en el compartimento CD4⁺ incluidos los linfocitos T reguladores), pero sin elevación de neutrófilos ni plaquetas.

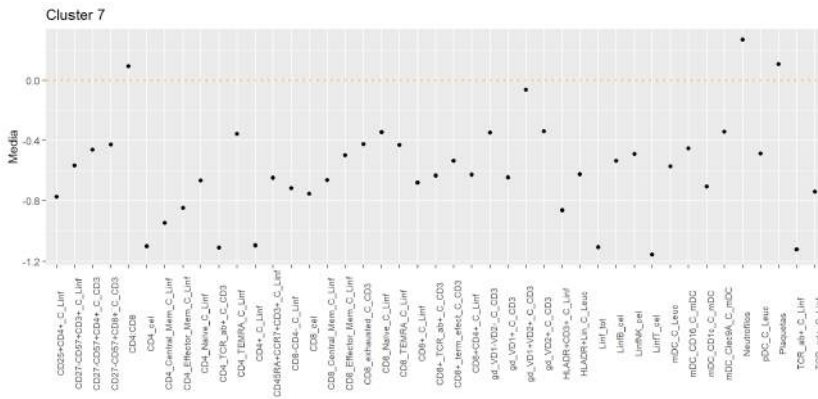


Figura 79. Diagrama de puntos con la representación de las medianas y rangos para los valores de cada población linfocitaria del “cluster” 7.

Y por último, el cluster 8 (n = 7) se distinguía globalmente por valores altos de linfocitos CD4⁺ con mayor estadio madurativo (TEMRA, CD57⁺CD27⁻...), así como la población doblemente positiva (CD4⁺CD8⁺).

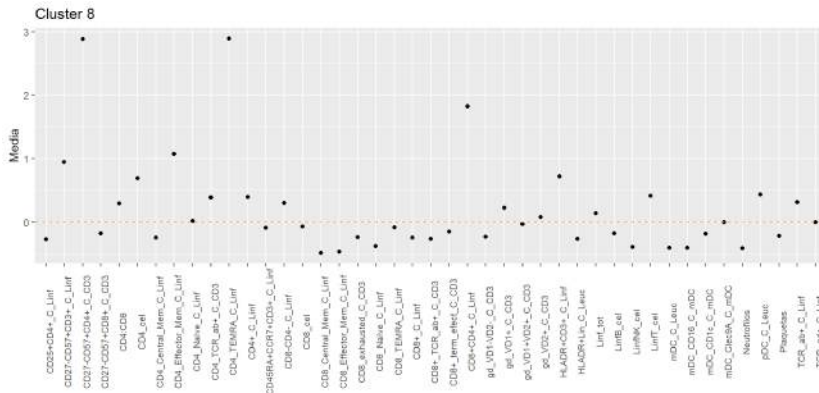


Figura 80. Diagrama de puntos con la representación de las medianas y rangos para los valores de cada población linfocitaria del “cluster” 8.

4.3.2. Relación entre los “clusters” y variables clínicas y parámetros inflamatorios

Con estos grupos definidos por su perfil inmune se aplicaron tests estadísticos para identificar potenciales diferencias en las características clínicas y otros parámetros analíticos entre los distintos *clusters* (Kruskal-Wallis para las variables continuas y test exacto de Fisher para las variables categóricas).

4.3.2.1. Muestra general

Las características clínicas estudiadas en el grupo global fueron la edad al diagnóstico, la situación funcional (ECOG), así como la agrupación de ambas variables y el estadio tumoral. También el porcentaje de pérdida de peso en los últimos 6 meses, el IMC, la clasificación nutricional y la valoración mediante la escala MNA así como variables inflamatorias

analíticas. Además, se estudió la posible relación de la clasificación por *clusters* y la puntuación de las escalas de ansiedad y depresión.

En cuanto a la edad, considerando los dos grupos definidos inicialmente, con punto de corte en 70 años, sí se encontró un mayor porcentaje de pacientes jóvenes en el *cluster* 1, 3 y 4; además, el *cluster* 6 estaba formado íntegramente por pacientes <70 años. Por otro lado, los pacientes ancianos fueron el grupo predominante en los *clusters* 2 y 8 (p valor de test exacto de Fisher = 0.043). Los datos se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Porcentajes de edad categorizada en cada "cluster" (jóvenes <70 años; ancianos ≥70 años)

Cluster	Jóvenes (%)	Ancianos (%)
<i>Cluster</i> 0	60.00	40.00
<i>Cluster</i> 1	72.92	23.08
<i>Cluster</i> 2	37.50	62.50
<i>Cluster</i> 3	85.71	14.29
<i>Cluster</i> 4	64.71	35.29
<i>Cluster</i> 5	57.14	42.86
<i>Cluster</i> 6	100.00	0.00
<i>Cluster</i> 7	45.00	55.00
<i>Cluster</i> 8	28.57	71.43

La agrupación en los *clusters* en función de las variables combinadas edad y ECOG, también fue estadísticamente significativa (p valor del test de Fisher = 0.046, tabla 7). Lo más llamativo es que todos los pacientes del grupo 6 eran jóvenes con situación funcional deteriorada según la escala ECOG. Además, en el *cluster* 1 el grupo predominante eran pacientes jóvenes con buena situación funcional; mientras que en el 8, el grupo mayoritario fueron pacientes ancianos con ECOG 0-1 y no se encontraron pacientes ancianos con ECOG 2-4.

Tabla 7. Porcentajes de los grupos de edad y ECOG en cada "cluster" (grupo 1: pacientes jóvenes con ECOG 0-1; grupo 2: pacientes ancianos con ECOG 0-1; grupo 3: pacientes jóvenes con ECOG 2-4 y grupo 4: pacientes ancianos con ECOG 2-4).

Cluster	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
<i>Cluster 0</i>	50.00	30.00	10.00	10.00
<i>Cluster 1</i>	69.23	15.38	7.69	7.69
<i>Cluster 2</i>	28.12	46.88	9.38	15.62
<i>Cluster 3</i>	42.86	0.00	42.86	14.29
<i>Cluster 4</i>	41.18	23.53	23.53	11.76
<i>Cluster 5</i>	47.62	28.57	9.52	14.29
<i>Cluster 6</i>	0.00	0.00	100.00	0.00
<i>Cluster 7</i>	25.00	35.00	20.00	20.00
<i>Cluster 8</i>	14.29	71.43	14.29	0.00

En cuanto a la situación funcional y nutricional, el hallazgo más llamativo se produjo en el *cluster* 6, ya que en éste la situación funcional fue peor (con una mediana de ECOG = 2) (p valor (Kruskal-Wallis) = 0.037. Estos pacientes además, parecían presentar una mayor pérdida de peso, con una media de peso perdido del 12% en los 6 meses previos al diagnóstico, aunque este hallazgo no fue estadísticamente significativo (p valor de Kruskal-Wallis 0.06) (representación en la figura 81).

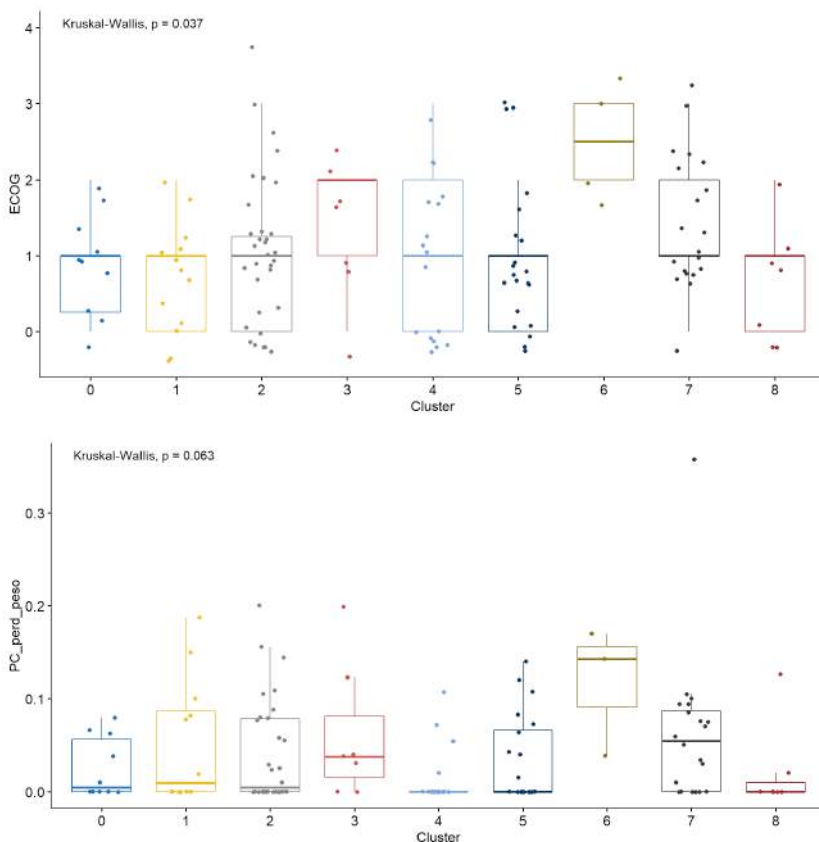


Figura 81. Diagramas de cajas y bigotes para cada “cluster” en las variables ECOG (arriba) y porcentaje de pérdida de peso (abajo).

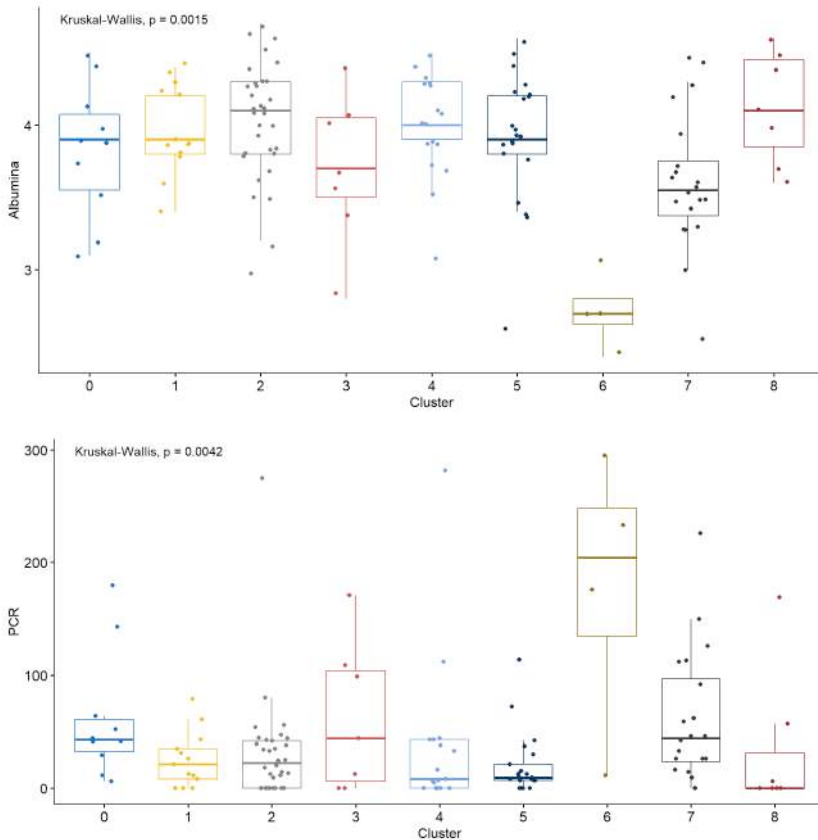
En cambio, no se encontró relación con el IMC (p valor Kruskal-Wallis = 0.4), la clasificación nutricional (normal – precaquexia – caquexia; p valor del test exacto de Fisher = 0.618). La clasificación en función del test MNA tampoco llegó a ser estadísticamente significativa, aunque llama la atención que todos los pacientes del grupo 6 tenían un test de MNA alterado (p valor del test exacto de Fisher = 0.074, tabla 8).

Tabla 8. Porcentajes de pacientes categorizada en cada “cluster” según la valoración del test MNA (normal >11 puntos; alterado ≤11 puntos).

Cluster	Normal (%)	Alterado (%)
<i>Cluster 0</i>	22.22	77.78
<i>Cluster 1</i>	61.54	38.46
<i>Cluster 2</i>	62.50	37.50
<i>Cluster 3</i>	42.86	57.14
<i>Cluster 4</i>	73.33	26.67
<i>Cluster 5</i>	44.44	44.45
<i>Cluster 6</i>	0.00	100.00
<i>Cluster 7</i>	42.11	57.89
<i>Cluster 8</i>	71.43	28.57

Respecto a las variables analíticas inflamatorias, también el grupo 6 destacaba por unos niveles de albúmina

significativamente más bajos (media = 2.72 g/dl, p valor de Kruskal-Wallis 0.001 comparándolo con todos los *clusters* restantes). También este grupo tenía niveles más elevados de parámetros relacionados con la inflamación como son PCR (media = 178.75 mg/dl; p valor de Kruskal-Wallis 0.004 comparándolo con todos los *clusters* restantes) e IL-6 (media = 117.62 pg/ml; p valor de Kruskal-Wallis 0.004 comparándolo con el resto de grupos). Los datos se muestran en la figura 82.



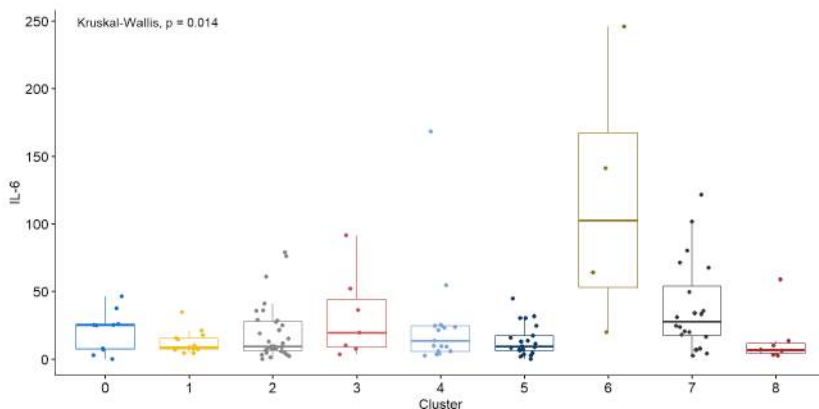


Figura 82. Diagramas de cajas y bigotes para cada “cluster” en las variables albúmina (página anterior), PCR (página anterior) e IL-6 (página actual).

Por último, ni el estadio tumoral, la expresión de PD-L1 ni la comorbilidad, la exposición tabáquica o la valoración emocional (con el test de ansiedad-depresión) mostraron relaciones estadísticamente significativas con los *clusters* descritos.

Se muestra también la distribución de los *clusters* en el modelo PCA. Podemos destacar que los pacientes de los grupos 6 y 7 se sitúan predominantemente en el cuadrante inferior izquierdo del gráfico izquierdo, mostrando linfopenia sobre todo en el compartimento CD4⁺. En la representación de las variables dim3 y dim4 (gráfico de la derecha), se observa además que los pacientes del *cluster* 6 se sitúan en el cuadrante superior derecho (no así los del grupo 7) ya que en este grupo se observó de forma característica neutrofilia, trombofilia, niveles altos de PCR y bajos de albúmina.

En los pacientes del *cluster* 0 predominaron las subpoblaciones de linfocitos CD8+ (por eso se situaron en la región inferior derecha del gráfico que representa las variables dim1 y dim2); mientras que en el grupo 5 predominaron los linfocitos CD4+ (cuadrante superior derecho).

Por último, destaca en el gráfico de dim3-dim4 el *cluster* 4, cuya población celular predominante fueron las células dendríticas (cuadrante superior izquierdo).

Todos estos datos representados mediante el modelo PCA concuerdan con las características inmunológicas predominantes en los distintos *clusters*.

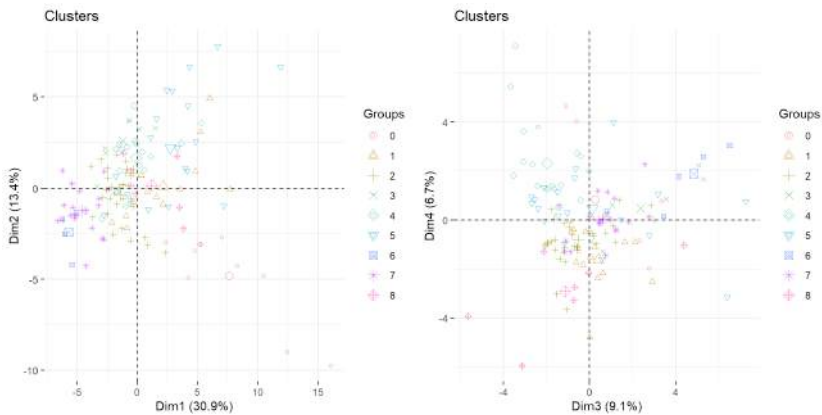


Figura 83. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes ancianos coloreados en función de clasificación por “clusters”, para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 y Dim4 (derecha).

4.3.2.2. Población anciana

En primer lugar, se describe a continuación la frecuencia de pacientes ancianos en cada *cluster* (tabla 9). Hay que destacar que en el grupo de pacientes ancianos, ninguno se clasificó en el *cluster* 6 (rango de edad = 52-65 años). Además, se excluyó del análisis aquellos grupos que contaban con menos de 4 pacientes, ya que no pueden extraerse conclusiones relevantes sobre dichos grupos.

Tabla 9. Frecuencia de pacientes ancianos en cada "cluster".

Cluster	Frecuencia (nº)
<i>Cluster 0</i>	4
<i>Cluster 1</i>	3
<i>Cluster 2</i>	20
<i>Cluster 3</i>	1
<i>Cluster 4</i>	6
<i>Cluster 5</i>	9
<i>Cluster 7</i>	11
<i>Cluster 8</i>	5

Se analizó de nuevo la relación de los *clusters* con la situación funcional (ECOG), la exposición tabáquica, el estadio tumoral y los parámetros nutricionales. Ninguna de estas variables mostró relación estadísticamente significativa con las

agrupaciones inmunológicas en los pacientes de 70 años o más. De todos modos, se muestra a continuación el estudio de la situación nutricional (tabla 10) y de la escala MNA (tabla 11 y figura 83), con p-valor cercano a 0.05.

Tabla 10. Porcentajes de pacientes categorizada en cada "cluster" según la situación nutricional en el grupo de pacientes ancianos. p-valor del test exacto de Fisher: 0.131.

Cluster	Normal (%)	Precaquexia (%)	Caquexia (%)
<i>Cluster 0</i>	50.00	0.00	50.00
<i>Cluster 2</i>	52.63	10.53	36.84
<i>Cluster 4</i>	83.33	0.00	16.67
<i>Cluster 5</i>	37.50	25.00	37.50
<i>Cluster 7</i>	18.18	9.09	72.73
<i>Cluster 8</i>	80.00	20.00	0.00

Tabla 11. Porcentajes de pacientes categorizada en cada "cluster" según la valoración del test MNA en el grupo de pacientes ancianos (normal >11 puntos; alterado ≤11 puntos). p-valor del test exacto de Fisher: 0.082.

Cluster	Normal (%)	Alterado (%)
<i>Cluster 0</i>	25.00	75.00
<i>Cluster 2</i>	60.00	40.00

Cluster	Normal (%)	Alterado (%)
<i>Cluster 4</i>	83.33	16.67
<i>Cluster 5</i>	37.50	62.50
<i>Cluster 7</i>	20.00	80.00
<i>Cluster 8</i>	80.00	20.00

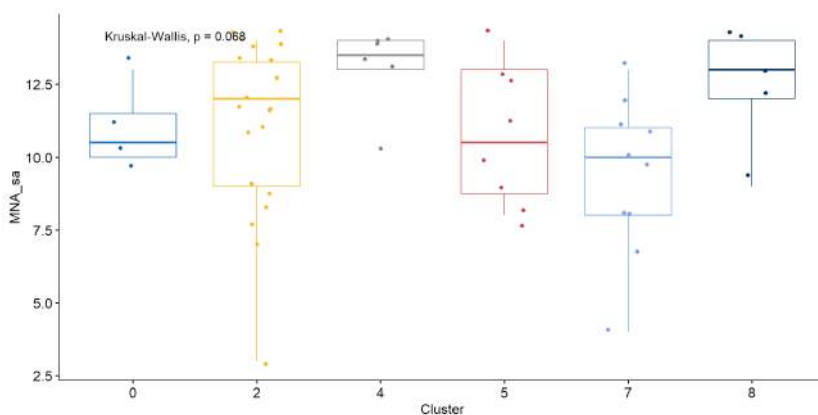


Figura 84. Diagramas de cajas y bigotes para cada "cluster" en función de la puntuación con el test MNA en el grupo de pacientes ancianos.

En cuanto al resto de la valoración geriátrica integral, los perfiles inmunológicos no fueron capaces de distinguir características clínicas diferenciales. A continuación se muestran algunos ejemplos (figuras 84-87). A continuación se representan gráficamente las medias, cuartiles y rango de los pacientes incluidos en cada *cluster* para la escala de cribado G8, la escala social de Gijón, los tests de depresión (dentro de la

valoración de ansiedad-depresión) y de Yesavage así como para el número de fármacos prescritos al paciente.

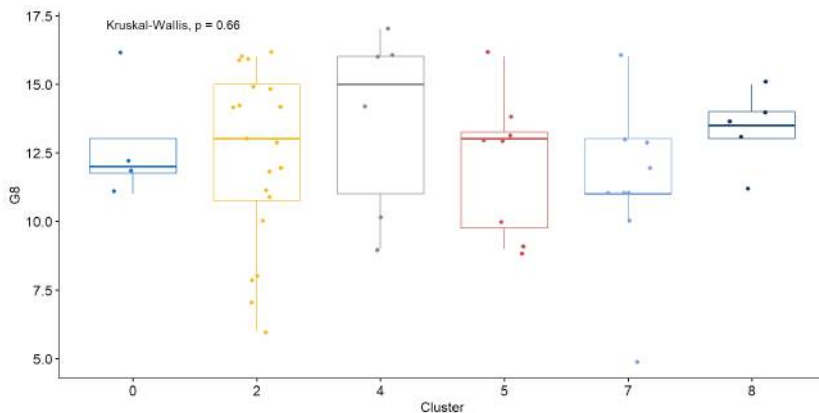


Figura 85. Diagramas de cajas y bigotes para cada “cluster” en función de la puntuación con el test G8 en el grupo de pacientes ancianos.

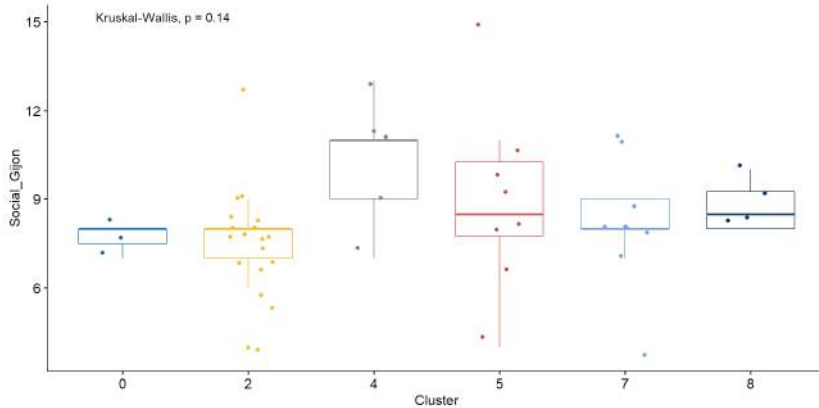


Figura 86. Diagramas de cajas y bigotes para cada “cluster” en función de la puntuación de la escala social de Gijón en el grupo de pacientes ancianos.

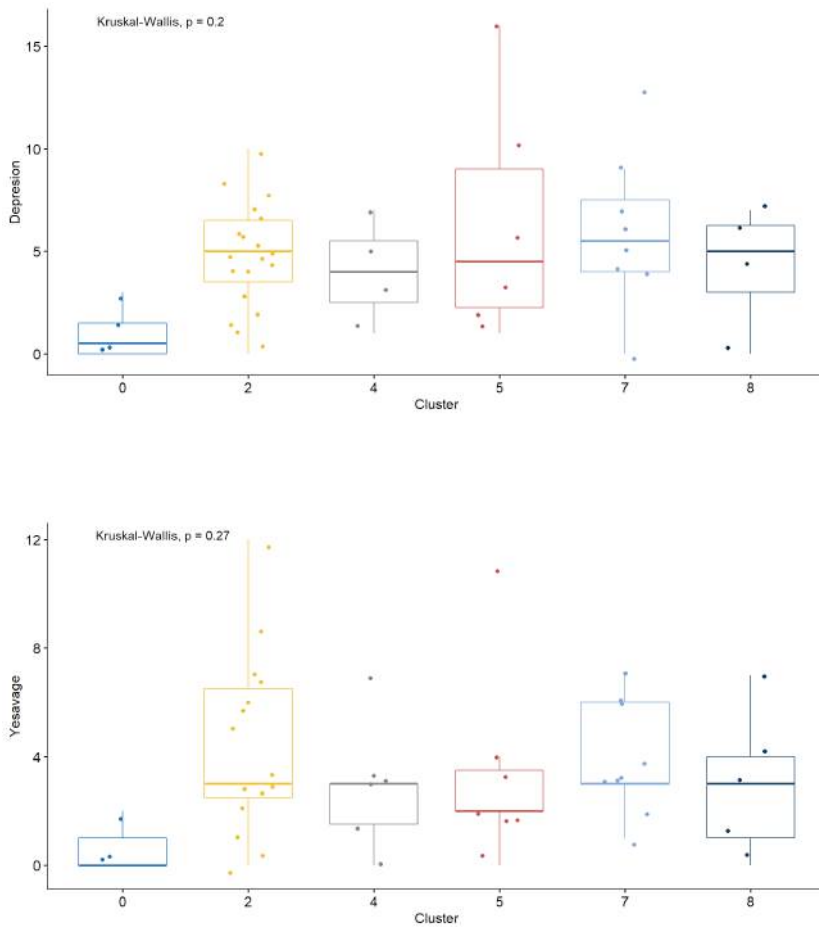


Figura 87. Diagramas de cajas y bigotes para cada “cluster” en función de la puntuación con el test de depresión (arriba) y el test de Yesavage (abajo) en el grupo de pacientes ancianos.

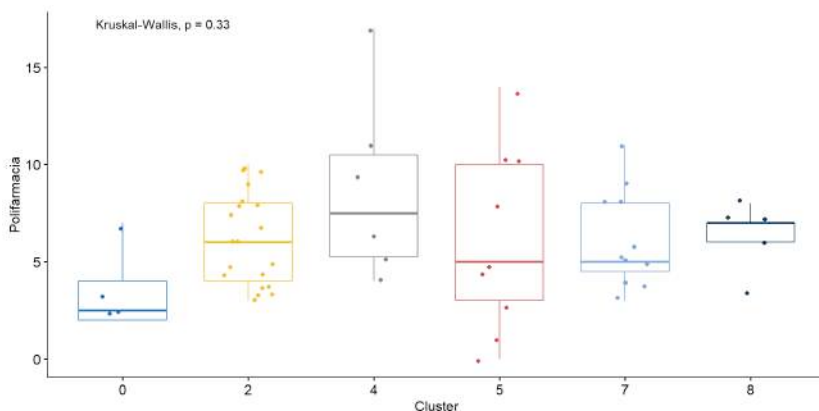


Figura 88. Diagramas de cajas y bigotes para cada “cluster” en función del número de fármacos prescritos en grupo de pacientes ancianos.

Las variables con puntos de corte establecidos fueron categorizadas según dicho parámetro (SPPB, test de valoración social de Gijón, escala de ansiedad-depresión, Yesavage, Pfeiffer y test mini-mental de Lobo). Tampoco dichas variables categorizadas mostraron relaciones estadísticamente significativas con los *clusters* definidos en este estudio. La tabla 12 es un ejemplo de la distribución para la variable SPPB categorizada.

Tabla 12. Porcentajes de pacientes categorizada en cada "cluster" según la valoración del test SPPB categorizado en el grupo de pacientes ancianos (sin limitación ≥ 10 puntos; limitación leve 7-9 puntos; moderada, 4-6 puntos; severa ≤ 3 puntos). p-valor del test exacto de Fisher: 0.182.

Cluster	No limitación (%)	Leve (%)	Moderada (%)	Severa (%)
Cluster 0	33.33	0.00	66.67	0.00
Cluster 2	16.67	11.11	72.22	0.00
Cluster 4	0.00	25.00	75.00	0.00
Cluster 5	42.86	14.29	14.29	28.57
Cluster 7	11.11	11.11	66.67	11.11
Cluster 8	50.00	25.00	25.00	0.00

Por último, también se estudió la posible correlación de las agrupaciones en función de las características inmunitarias con las clasificaciones geriátricas de Balducci (tabla 13) y SIOG1 (tabla 14), pero no se hallaron diferencias entre los distintos grupos.

Tabla 13. Porcentajes de pacientes categorizada en cada “cluster” según la clasificación geriátrica de Balducci. p-valor del test exacto de Fisher: 0.308.

Cluster	Fit (%)	Vulnerable (%)	Frágil (%)
Cluster 0	75.00	0.00	25.00
Cluster 2	40.00	25.00	35.00
Cluster 4	50.00	0.00	50.00
Cluster 5	22.22	0.00	77.78
Cluster 7	18.18	36.36	45.45
Cluster 8	40.00	20.00	40.00

Tabla 14. Porcentajes de pacientes categorizada en cada “cluster” según la clasificación geriátrica de SIOG1. P-valor del test exacto de Fisher: 0.823.

Cluster	Fit (%)	Vulnerable (%)	Frágil (%)	Muy frágil (%)
Cluster 0	75.00	25.00	0.00	0.00
Cluster 2	40.00	35.00	20.00	5.00
Cluster 4	50.00	33.33	16.67	0.00
Cluster 5	33.33	33.33	33.33	0.00
Cluster 7	20.00	70.00	10.00	0.00
Cluster 8	40.00	60.00	0.00	0.00

Con estos datos, no podemos inferir que los parámetros analizados en la valoración geriátrica integral pueden predecir patrones inmunológicos de los pacientes con CPNM.

DISCUSIÓN

*On no falta voluntat
sempre hi ha un camí.*

John Ronald Reuel Tolkien

5. Discusión

5.1. Análisis exploratorio de la muestra

5.1.1. Variables demográficas

5.1.1.1. Edad y sexo

La mediana de edad del diagnóstico del cáncer de pulmón se sitúa actualmente en 71 años, siendo las edades más frecuentes de diagnóstico entre los 65 y 74 años [292]. Estos datos son similares a la mediana obtenida en la muestra del estudio (68 años). La distribución por sexo muestra un predominio en los varones, con una ratio varones:mujeres = 3.5:1 (frente a una tasa de 56.3 casos en varones /100000 individuos y de 46.7 mujeres /100000 habitantes publicada en la literatura). Mientras que la incidencia del cáncer de pulmón ha ido en descenso a nivel global en ambos sexos, en España se ha mantenido estable [293], con una trayectoria superponible a la del consumo tabáquico pero con una demora de unos 20-40 años [294]. Por eso, dado que en España el consumo de tabaco en varones empezó a descender de forma más tardía respecto a otros países de la Unión Europea, se explica que más de 3/4 de la población de nuestro estudio fuesen varones.

5.1.1.2. Hábito tabáquico

En consonancia con los datos previos, menos del 10% de los pacientes no habían consumido nunca tabaco, y alrededor de

1/4 de la muestra presentaban hábito tabáquico activo, lo cual difiere de otras publicaciones españolas [295], aunque este dato podría estar infraestimado por los pacientes cuyo abandono del hábito tabáquico se había producido en el contexto del diagnóstico de la neoplasia de pulmón, y no en todos los casos este abandono es permanente; ya que este hecho no se recogía específicamente en la historia clínica. De todos modos, la tendencia actual, sobre todo desde la implementación de la Ley 28/2005, posteriormente modificada con la ley 42/2010 ha sido un descenso del consumo tabáquico en nuestro país, pero se han descrito diferencias en distintos estratos socioeconómicos que podrían justificar la alta incidencia de tabaquismo en nuestro estudio [296], aunque esto no fue analizado específicamente.

5.1.2. Variables clínicas

5.1.2.1. ECOG

En esta población estudiada llama la atención la baja tasa de paciente con ECOG 3 o 4 respecto a otras publicaciones (7.6 y 0.8%, respectivamente) [297], a pesar del predominio de estadios avanzados en la muestra. Esto podría explicarse porque sólo se incluyeron pacientes que llegaron a ser valorados en el servicio de oncología médica. Probablemente, otros pacientes con mala situación funcional no llegaron a completar la valoración diagnóstica y por tanto no fueron valorados por parte de oncología, ya que no eran candidatos a tratamiento activo.

5.1.2.2. Variables clínicas nutricionales

En el estudio el porcentaje de pacientes de bajo peso según su IMC fue muy bajo, no obstante, más de 1/3 de ellos presentaban una pérdida de peso $\geq 5\%$, principalmente en los grupos de pacientes con ECOG deteriorado, independientemente de la edad, lo cual, es un predictor más potente de supervivencia que el IMC [298]. Además, también alrededor de 1/3 de la muestra se diagnosticó de caquexia. Esto nos indica que el IMC como parámetro único es insuficiente para la valoración nutricional de los pacientes con cáncer de pulmón, y de hecho, se ha descrito el término de obesidad sarcopénica [299] cuyo diagnóstico supone un reto y requiere adaptación nutricional específica. En esta línea, se ha demostrado que los pacientes obesos con criterios de desnutrición tienen peor pronóstico que los pacientes obesos con valoración nutricional normal [300].

Por ello, también se realizó a todos los pacientes la valoración de cribado nutricional MNA. Ésta, mostró que casi la mitad de la muestra presentaba un riesgo de desnutrición o criterios de desnutrición establecida y por tanto, se beneficiaría de una intervención a ese nivel. Este hecho, afectó por igual a pacientes jóvenes y ancianos y por ello es crucial realizar una valoración nutricional independientemente de la edad del paciente, y no basada exclusivamente en el peso y la talla, ya que la desnutrición es uno de los factores clínicos pronósticos clásicos en CPNM en diferentes estadios [301–303].

5.1.2.3. Comorbilidad

Se analizaron las comorbilidades que más frecuentemente se asocian a los fenómenos de inmunosenescencia junto con el cáncer [236]. La comorbilidad más prevalente fue la diabetes mellitus (DM) (alrededor del 24%), seguida de la comorbilidad cardiaca isquémica y las enfermedades neurodegenerativas (principalmente demencia).

Aunque los datos en cuanto al impacto pronóstico de la concurrencia de diabetes y CPNM en el mismo paciente es controvertido [304, 305], y se ha mostrado como un factor de mal pronóstico en pacientes con enfermedad localizada intervenidos [306, 307], parece que los pacientes con buen control glucémico tienen la misma evolución que los pacientes sin DM [308].

La enfermedad cardiaca, además, se relaciona con la edad y con la exposición al tabaco (ambos factores íntimamente relacionados con el cáncer de pulmón). La tasa de pacientes con cardiopatía isquémica fue < 20%, lo cual es algo inferior a lo descrito en otras series [309], esto podría también estar infraestimado porque en los pacientes con importante comorbilidad puede que no llegara a realizarse biopsia diagnóstica y también porque en otros estudios se han incluido exclusivamente pacientes ≥ 65 años, con lo cual la presencia de cardiopatía es mucho más frecuente [310]. Además, se trata de un valor más cercano al publicado en el análisis español del registro de tumores torácicos [295].

Por último, la incidencia de demencia en los pacientes con CPNM, aunque sigue siendo baja [311], ha ido en aumento en

los últimos años [312]. Cabe destacar además que en los pacientes por cáncer la tasa de demencia típicamente ha sido menor que en la población general, debido por un lado, al acortamiento de la supervivencia de los pacientes con CPNM (que teóricamente fallecerían antes del desarrollo de la demencia) y por otro lado, por retrasos diagnósticos [313].

Con toda esta evidencia, es importante el análisis de la comorbilidad de los pacientes con CPNM, en especial de la población anciana, donde suele ser más frecuente [267, 314]. De hecho, en esta muestra, la media de edad de los pacientes con comorbilidad fue más elevada que la de los pacientes sin cada una de las comorbilidades. Y esto influirá en el pronóstico de forma directa [315], pero también en las decisiones terapéuticas, de modo que, los pacientes con más patologías concurrentes o comorbilidad mal controlada, no reciben tratamiento activo o bien se les administra alternativas menos tóxicas al tratamiento de primera elección [316] y desde luego, son un criterio de exclusión para participar en ensayos clínicos [317], lo cual limita conocer su impacto en la evolución de la enfermedad.

5.1.2.4. Valoración social y emocional del grupo global de pacientes

La mayoría de estudios que hacen referencia a la situación socioeconómica como factor de desigualdades en cáncer coinciden que una situación socioeconómica desfavorable aumenta el riesgo de cáncer de pulmón (especialmente en

varones), sobre todo, debido al mayor consumo de tabaco en esta población [318]. No obstante, estos datos están basados en información poblacional y no individual [319].

En cuanto a la clasificación por el nivel de estudios casi la mitad de la población del estudio tenía estudios elementales y solamente un 10% había cursado estudios superiores. El nivel de estudios se ha vinculado en publicaciones previas con el riesgo de cáncer de pulmón de forma indirecta (como parte del estatus socioeconómico que incluye los estudios, profesión e ingresos) [318, 320]; y también de forma directa [321]. Esto es en parte por una posible exposición ocupacional en función de la profesión [322], pero sobre todo, por una mayor tasa de consumo de tabaco en este grupo poblacional [323]; de hecho esto podría estar también relacionado con la alta incidencia de tabaquismo en nuestra muestra.

Respecto a la valoración social, más de la mitad de los pacientes del estudio estaban casados (57.3%), lo cual es similar a otras publicaciones [324, 325]; siendo el grupo de pacientes solteros el minoritario (4.6%); de todos modos, casi 3/4 partes de la muestra vivían acompañados. Sorprendentemente existen datos del impacto del estado civil en la supervivencia de pacientes con cáncer de pulmón, de modo que los pacientes casados presentan una mejor supervivencia aunque los datos provienen fundamentalmente de estudios asiáticos [324, 326]. Probablemente, esto tenga menos impacto en países en los que haya una mayor cobertura de servicios sociales, o bien, en los que la comunidad sea un elemento

implicado en el cuidado de los individuos que la conforman aunque este hecho no se ha estudiado prospectivamente.

La escala de valoración social MOS, diseñada para la evaluación de pacientes con enfermedades crónicas, permite valorar el apoyo social estructural (a través de preguntas sobre sus amigos y familiares) así como su apoyo funcional percibido, y fue validado en pacientes con cáncer en nuestro país [327]. En nuestro caso, empleamos la versión simplificada de 5 ítems para facilitar la realización del análisis holístico de los pacientes sin que les resultase tedioso junto con el resto de la valoración [259]. La media de puntuación en la escala MOS fue de 20 para los pacientes ancianos y 22 para los jóvenes (sobre un máximo de 25 puntos) con diferencias estadísticamente significativas.

Los pacientes de nuestra muestra por tanto, presentan una buena percepción en cuanto a su apoyo social. El impacto de la situación social en cáncer ha sido sobre todo investigada en pacientes con cáncer de mama [328] o bien en cohortes con cáncer de distintas localizaciones analizadas conjuntamente. Por esto, y por la influencia de la situación emocional como factor en la percepción del apoyo social de los pacientes con cáncer [329] (incluido el cáncer de pulmón), es muy relevante el análisis de estos parámetros.

De hecho, el artículo publicado del registro español de tumores torácicos por *Provencio, M et al* se describe una incidencia de ansiedad-depresión del 6.2% [295], no obstante, no hay que olvidar que estos datos se refieren a diagnósticos indexados en las historias clínicas, mientras que los datos de

nuestro estudio son de la valoración realizada en la primera visita de oncología. Incluso así, las tasas de ansiedad-depresión fueron similares a esos datos, con un 6.1% de casos clasificados como depresión establecida y el mismo porcentaje de ansiedad establecida con el test de ansiedad-depresión (HADS) en la población global.

En cuanto a los dos grupos poblacionales, encontramos un 8.3% de pacientes jóvenes con ansiedad; mientras que para los pacientes ancianos la tasa fue del 3.4%; estas diferencias ya habían sido descritas en publicaciones previas (aunque no en cáncer de pulmón concretamente) [330]. La depresión también predominaba en el grupo de pacientes <70 años (5.5% frente a 3.4%). En el estudio realizado en Alemania por *Hinz et al.* [330] las tasas de depresión y ansiedad establecidas fueron claramente superiores a las nuestras, aunque hay que destacar que ambos diagnósticos eran mucho más frecuentes en mujeres (casi un 20% de casos de ansiedad y 12% de depresión), que están menos representadas en nuestra muestra por la incidencia diferencial de género del cáncer de pulmón; además, en este estudio se incluyeron tumores de múltiples localizaciones, siendo el cáncer de pulmón sólo un 11% de los casos. Lo que sí se ha descrito en otras series también, es una tasa relativamente baja de depresión en pacientes varones con cáncer (que son la población mayoritaria del estudio) [331]. De todos modos, esto se analizó también con una escala específica del paciente anciano (Yesavage) y se comentará posteriormente.

5.1.2.5. Valoración geriátrica integral

La mayoría de los pacientes ≥ 70 años tenían una puntuación anormal en la escala de *screening* G8 (casi un 70%), y esta tasa puede llegar a ser superior en otros estudio [332, 333], lo cual apoya la realización de una valoración geriátrica integral en los pacientes con CPNM previo a tomar decisiones terapéuticas. Ésta, ha demostrado en pacientes ancianos con cáncer que podría detectar limitaciones de forma más fidedigna que el estado funcional medido mediante la escala ECOG exclusivamente [334].

Aunque sí existe bastante consenso respecto a las áreas que deben ser evaluadas en una VGI [267], las escalas empleadas para la valoración de cada uno de estos aspectos no se han homogeneizado [335–337], lo cual puede llevar a diferencias en los datos de diferentes estudios, a pesar de que se empleen en todos los casos tests estandarizados en pacientes con cáncer. De modo análogo a otros estudios, el ámbito con mayor tasa de deterioro detectado fue el nutricional [338]; seguido de la independencia para actividades instrumentales (alrededor del 40% de los casos tenían necesidad de apoyo en al menos una de las actividades); y en tercer lugar, la carencia en el ámbito social (casi un 17% de los pacientes tuvieron un deterioro severo con la escala de Gijón, hecho que difiere con lo evaluado con la escala de MOS ya que la primera está más centrada en aspectos objetivos, mientras que la escala de MOS simplificada se focaliza en el apoyo social percibido, y por tanto, más subjetivo).

La pérdida de la movilidad con la escala SPPB afectaba de forma severa a un 5.1% de los pacientes ancianos, pero si se tienen también en cuenta los pacientes con limitación moderada sería el área con mayor índice de afectación ya que supondría casi el 50% de los casos, que también ha sido un factor predominante en otras investigaciones [338].

Si consideramos la situación cognitiva mediante el cuestionario de Pfeiffer también un 17% presentarían deterioro cognitivo leve- moderado, mientras que ningún paciente presentaba deterioro cognitivo severo (ya que estos probablemente no llegaron a remitirse a oncología); en cambio, con el test mini-mental de Lobo, sólo un 8.5% de la población presentaba deterioro cognitivo. Este porcentaje es menor al de otras series [337, 338], pero similar al estudio de *Jeppesen et al.* [332]. Estas disparidades pueden deberse a las diferencias en cuanto a la metodología (uso de diferentes escalas) y también a las medianas de edad de los pacientes de las diferentes publicaciones (alrededor de 79 años en los 2 primeros estudios y 72 en el de *Jeppesen et al.*, aunque era de 77 en nuestros datos).

Queda por destacar en cuanto a la valoración emocional, que la tasa de depresión establecida era similar a la detectada con el cuestionario HADS, pero con la escala de Yesavage se detectaron además casi un 17% de pacientes ≥ 70 años con una posible depresión leve que debería considerarse para valoración por psicólogo o psiquiatra para un diagnóstico definitivo.

Y por último resaltar que en la mayoría de publicaciones que hacen referencia a la VGI en pacientes con cáncer de pulmón, ésta fue sólo realizada en aquellos pacientes cuyo oncólogo médico lo consideró necesario, y esta decisión no siempre estaba basada en la realización de un test de cribado (como G8) [333, 339], mientras que en nuestro caso, todos los pacientes fueron evaluados de forma completa, lo cual es una de las fortalezas de este estudio.

Del mismo modo, en muy pocos estudios se realiza una clasificación estandarizada de los pacientes en *fit*, vulnerables y frágiles [339], lo cual dificulta la interpretación de los resultados por las diferentes escalas empleadas. En cambio en nuestro análisis, con los datos obtenidos de la VGI se emplearon las clasificaciones de Balducci y SIOG1. Es llamativo que las dos coincidían en que algo más de 1/3 de los pacientes podían considerarse *fit*, pero la clasificación como vulnerable o frágil difería de forma significativa entre ambas. Esto se debe a que las diferencias principales entre ellas son, por un lado, que la escala SIOG1 tiene en cuenta aspectos nutricionales, y aunque muchos pacientes tenían criterios de riesgo de desnutrición, la malnutrición establecida entendida como una pérdida de peso >10% en 6 meses o 5% en 1 mes (que clasificaría a los pacientes como frágiles) sólo se detectó en un 8% de casos aproximadamente; mientras que la pérdida de un 5% del peso en los 6 meses previos, que sí fue un hallazgo frecuente en la muestra, clasificaría a los pacientes como vulnerables. Por otro lado, la escala Balducci clasifica directamente a los pacientes

como frágiles si tienen algún síndrome geriátrico, lo cual ocurría en >40% de la población del estudio.

5.1.3. Variables del tumor

De nuevo, debido a la tendencia de consumo tabáquico en nuestro país, el descenso de incidencia de carcinoma escamoso de modo que, la histología mayoritaria fuese adenocarcinoma, fue posterior a otros países, y en la literatura, se identifica España (y Países Bajos) como países en los que todavía la histología predominante es el carcinoma escamoso [293]. No obstante, la tendencia global de predominio de adenocarcinoma ya se muestra en nuestro estudio y en otras publicaciones recientes [295, 340, 341]. Esto concuerda también con una mayor mediana de edad de los pacientes diagnosticados de carcinoma escamoso.

La expresión de PD-L1 [342], así como la distribución por estadios concuerda con los datos de otras publicaciones [295, 343] (salvo en el caso de los estadios I, que mostraron una tasa inferior porque sólo los casos que tenían indicación de tratamiento adyuvante fueron remitidos a oncología médica para valoración); por lo tanto nuestra muestra puede considerarse una representación adecuada de los pacientes con CPNM de vida real. Probablemente los pacientes con estadios más tempranos fueron de mayor edad porque es más frecuente la realización de radiografías y tomografías computerizadas de tórax por patologías intercurrentes o como estudios

prequirúrgicos, con lo cual hay más casos de hallazgos incidentales y de diagnóstico en estadios más precoces.

5.1.4. Variables analíticas

En cuanto a los parámetros analíticos, se debe resaltar que la hipoalbuminemia fue un hallazgo infrecuente (alrededor del 15% de la población). La hipoalbuminemia está íntimamente relacionada con la situación nutricional de los pacientes, y esto concuerda con una presencia relativamente baja de pacientes que cumplían criterios de caquexia. Por otro lado, también la hipoalbuminemia se relaciona con la situación inflamatoria del individuo, pero a diferencia de la baja tasa de hipoalbuminemia en esta muestra, aproximadamente 2/3 de los pacientes presentaban niveles de PCR ≥ 10 mg/l. Debe resaltarse de todos modos, que existen otros muchos parámetros relacionados con la situación inflamatoria además de un estado nutricional deficiente; por ejemplo, las neoplasias avanzadas se relacionan con un grado de inflamación mayor [344]. Dado que más del 50% de los casos se diagnosticaron de CPNM estadio IV, y más de 1/3 de estadio III, esto podría justificar la alta tasa de pacientes con PCR por encima del valor normal.

La mediana de linfocitos totales fue 1400 células/ μ l y la población mayoritaria, fueron los linfocitos T CD4⁺, suponiendo casi el doble de los linfocitos CD8⁺ (medianas 606 y 342, respectivamente). Aunque en otras series se describe ya el predominio de los linfocitos CD4⁺ [345, 346], nuestras cifras

están por debajo de las descritas para adultos sanos en otras publicaciones de población hispana [347, 348]. En concreto, en el estudio realizado en el Hospital Arnau de Vilanova (Valencia) se describen medianas de 1000 linfocitos CD4⁺ / μ l (rango: 225 – 2032), y 650 CD8⁺ (rango: 177 – 2249); no obstante hay que tener en cuenta dos factores diferenciales significativos entre la muestra del estudio de *Andreu-Ballester et al.* y la de nuestro trabajo: por un lado, incluyeron pacientes con un amplio rango de edad (18-95 años), y en su estudio todos grupos de edad tenían un número similar de individuos, mientras que en nuestra muestra el paciente de menor edad tenía 42 años, además de que sólo 13% de los casos eran menores de 55 años y solamente alrededor de un 10% de los pacientes eran mayores de 85 años, con lo cual no tenemos representadas de forma significativa edades extremas debido, tanto a la edad mediana de diagnóstico del cáncer de pulmón, como al hecho que los pacientes muy añosos que no son candidatos a tratamiento activo no completan el estudio diagnóstico y no podían incluirse en este estudio. La otra gran diferencia consiste en que el resto de investigaciones hasta el momento para la descripción de los rangos de referencia de poblaciones linfocitarias, se han hecho en población sana, y existen muy pocos datos en pacientes con cáncer de pulmón, e incluso en los pocos estudios recientes que analizan el impacto de las poblaciones linfocitarias en este grupo de pacientes, no suelen detallarse los números absolutos de dichas poblaciones y en ocasiones tampoco la distribución de las mismas [349, 350], por ello el presente trabajo aporta una

descripción amplia y detallada de la situación inmunológica de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico.

Respecto a las subpoblaciones linfocitarias, entre los linfocitos CD4⁺, predominaron los centrales de memoria (18.5% de linfocitos) seguidos de los linfocitos *naïve* (15.7%), mientras que los linfocitos maduros (CD27⁻CD57⁺CD4⁺ y TEMRA) representaron una escasa proporción, <2%. En cambio, en otras investigaciones, la población predominante son los linfocitos inmaduros [345, 346, 351], si bien es cierto que la mediana de edad en nuestra muestra es mayor a otras, y en algunos de ellos no se incluyeron pacientes >70 años, sabiendo los linfocitos *naïve* son los que más disminuyen con la edad [351].

Por otro lado, en el subgrupo de linfocitos CD8⁺, predominaron los linfocitos maduros (7.9%), efectores de memoria (5.1%) y TEMRA (5%); mientras que en otras series con población sana y media de edad más joven, seguían predominando los linfocitos CD8⁺ *naïve* [346], lo que indica que la distribución de estas células se afecta más con la edad y otros factores, por lo que en una muestra envejecida y con tumores predominantemente avanzados como la incluida en este estudio, las células CD8⁺ más abundantes son las más diferenciadas. Estos datos sugieren además, que los cambios en las subpoblaciones de linfocitos CD8⁺ y CD4⁺ no tienen por qué producirse al mismo tiempo ni de la misma forma.

En cuanto a los linfocitos T reguladores (definidos como CD25⁺CD127^{low}CD4⁺) representaron el 2.4% (rango 0 – 6.4) del total de los linfocitos, con una mediana de 35 células/ μ l (0 – 138). Los valores considerando los linfocitos CD25⁺CD4⁺ fueron similares. Esta mediana es menor a la publicada en otras series [345], lo cual es llamativo, ya que en lo que respecta a los linfocitos T reguladores, se ha descrito un aumento de sus niveles con la edad [352], e incluso mayor en pacientes añosos diagnosticados de CPNM [248], representando alrededor de un 10% de los linfocitos CD4⁺. De todos modos, en el estudio de *Hou et al.* la tasa de pacientes fumadores era mucho menor que en nuestra muestra, y aunque los datos no son del todo concluyentes, la exposición tabáquica parece reducir el número y funcionalidad de los linfocitos T reguladores [353]. Por otro lado, en ese análisis predominaban estadios localizados o localmente avanzados, y se especula que en estadios más avanzados, los linfocitos T reguladores son reclutados al microambiente tumoral y podrían por tanto disminuir en sangre.

El recuento de linfocitos T $\gamma\delta$ de este estudio fue algo menor que en publicaciones previas (mediana 27 céls/ μ l (rango 2 – 126)), realizadas en individuos sanos la península ibérica (mediana 63 céls/ μ l (9 – 253) [354] y 70 (5 – 319) representando un 3.1% de los linfocitos totales [347]). Esto podría deberse a la mediana de edad de nuestra muestra (cercana a 70 años). El porcentaje de linfocitos V δ 2⁺ fue la mayoritaria en el presente estudio, pero también su porcentaje es menor a la descrita en otras investigaciones, aunque muchas de éstas incluyen

neonatos, niños y adultos jóvenes, a diferencia del presente estudio. De todos modos, sí se ha descrito una disminución progresiva de este subgrupo de linfocitos que se inicia a edades tempranas, cuya media está alrededor del 1.5% de los linfocitos T en adultos mayores de 30 años sanos [355]; estando estas cifras en consonancia con nuestros datos (media 1.6%; mediana 1%). También la presencia del cáncer de pulmón podría tener relación con la reducida proporción de linfocitos $V\delta 2^+$, ya que estos cambios se han descrito previamente en pacientes con melanoma [356], y en una pequeña cohorte de 20 pacientes diagnosticados de CPNM [357]. Todos estos datos apoyan el hecho que los linfocitos T $V\delta 2^+$ son más susceptibles a la activación persistente que se produce con los estímulos antigénicos, tanto de infecciones y otros antígenos a los que estamos expuestos con la edad, como los propios antígenos tumorales. Estos estímulos inducirían la pérdida de expresión de moléculas coactivadoras (como CD27 y CD28) cuya presencia es crítica para la proliferación y supervivencia de los linfocitos por lo que su número absoluto y proporción se ve disminuido en este contexto. No obstante, estos datos deben todavía confirmarse, y podrían ser diferentes para distintos tumores, ya que se ha descrito también un aumento de linfocitos T $\gamma\delta$ en pacientes con cáncer gástrico [358], aunque en este caso 2/3 de los pacientes estaban diagnosticados de enfermedad localizada (estadio I) y que además se trata de un estudio asiático que es difícilmente extrapolable a nuestra población.

En cambio, el número de linfocitos T $\gamma\delta V\delta 1^+$ queda relativamente preservado con la edad y se afecta más por la

presencia de infección crónica por CMV [359], y por otro lado, también se ha descrito aumento de esta subpoblación en pacientes diagnosticados de melanoma avanzado frente a individuos sanos [360, 361], definiendo incluso un posible valor pronóstico negativo.

Por último, prácticamente toda la población había estado expuesta a CMV. Este virus de la familia *herpes* es un patógeno persistente, que no produce sintomatología en individuos inmunocompetentes y que puede estar presente hasta en un 60-90% de la población adulta, en función de la región. De hecho, España es una de las localizaciones donde la prevalencia de la infección por CMV es más alta (alrededor del 80-90%, como ocurre en nuestra muestra) [362], por lo que es difícil obtener una muestra seronegativa de suficiente envergadura para realizar estudios comparativos en población adulta, y especialmente en población anciana.

5.2. Relación entre variables

5.2.1. Relación entre variables clínicas

La relación entre el antecedente de hábito tabáquico y el sexo masculino se ha descrito previamente [293], sobre todo en población anciana. Debido a condicionantes culturales y socioeconómicos la tasa de varones fumadores/exfumadores en nuestro medio sigue siendo mayor a la de las mujeres aunque esta última está descendiendo más lentamente [363].

Aunque se ha hallado una relación moderada con el estadio y la valoración en la escala MNA, el nexo con la clasificación nutricional (normal – preaquexia – caquexia) fue clínicamente poco relevante (V de Cramér 0.38), lo que indica que, existe mayor riesgo de desnutrición en estadios avanzados, aunque el desarrollo de un síndrome clínico florido puede darse también en estadios algo más precoces [302].

De modo similar, los pacientes con situación funcional más deteriorada presentaban un mayor porcentaje de pérdida de peso y menor puntuación en la escala MNA. Tanto la situación funcional como la pérdida de peso son factores pronósticos clásicos en la evolución del cáncer de pulmón no microcítico [298, 364]; además, como se detallará más adelante, tanto el deterioro del ECOG como la pérdida significativa de peso se han correlacionado previamente con parámetros inflamatorios que forman parte del síndrome de caquexia asociada al cáncer, que en su estadio final se acompaña de un mal estado funcional y mala evolución [257]. Esta relación entre ECOG deteriorado con parámetros de malnutrición había sido descrita previamente en muchos trabajos [365], asociada además a una disminución de la calidad de vida de los pacientes con CPNM.

De todos modos, la situación funcional no se correlacionó de forma significativa con la valoración nutricional (normal, preaquexia o caquexia) en el análisis univariable, lo cual podría deberse a la presencia de otros factores asociados, como la situación inflamatoria de base, que puede verse influida por otras variables como el estadio tumoral.

En cuanto a la situación emocional, se ha hallado una mayor incidencia de ansiedad en las mujeres de nuestra muestra, lo cual se ha descrito también en población no oncológica [366]. Aunque en este hecho pueden influir muchos factores (sociales, culturales, genéticos, así como de configuración cerebral), se cree que uno de los principales elementos que determinan estas diferencias de sexo en los trastornos emocionales son los cambios hormonales que se producen en las mujeres en edad reproductiva, en las que se describe hasta el doble de incidencia de cuadros depresivos respecto a hombres de la misma edad [367]; esto puede ser más llamativo todavía en el postparto o en la transición a la menopausia.

No obstante, la mayoría de mujeres de nuestra muestra no estaban ya en edad reproductiva, por lo que no encontramos diferencias en la incidencia de depresión entre hombres y mujeres. En cambio, muchos estudios han descrito que las mujeres de todas las edades (incluso desde la infancia) tienen mayor sensibilidad para la ansiedad y sus síntomas acompañantes (como sensación de ahogo o desvanecimiento) así como mayor reactividad ante un trauma que los hombres [366]. Seguramente por este motivo, hemos encontrado niveles más elevados de ansiedad en las mujeres.

Respecto a la asociación entre la presencia de síntomas depresivos y otras características clínicas, se encontró una relación inversa con la puntuación en la escala MNA, de forma análoga a lo descrito en otros estudios en población no oncológica [368]. De hecho, la situación nutricional así como aspectos concretos de la alimentación han demostrado ya su

impacto tanto en el desarrollo como en la evolución de los cuadros depresivos [369]. También el apoyo social ha sido descrito previamente como un factor asociado al desarrollo de depresión [370].

Por último, probablemente los pacientes con enfermedades neurodegenerativas se diagnostican de forma más tardía y, por tanto, en estadios más avanzados, ya que tienen mayor dificultad para expresar síntomas que hagan sospechar una neoplasia subyacente. También puede ocurrir que estos síntomas se atribuyan al propio cuadro neurológico.

5.2.2. Relación entre variables inmunológicas e inflamatorias

La IL-6 es una molécula pleiotrópica en el proceso inflamatorio-inmunológico; es decir, tiene efectos distintos (incluso antagónicos) en función de su lugar de acción, y modula tanto la inmunidad innata como la adaptativa. También interviene en procesos metabólicos como la glicólisis o la oxidación de ácidos grasos, convirtiendo los sistemas inmune y metabólico en elementos integrados e interdependientes. Por esto tiene relación con la obesidad, la diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y el cáncer.

En concreto, la IL-6 en la carcinogénesis promueve la angiogénesis, la degradación de la matriz extracelular facilitando la migración y el desarrollo de metástasis y además, favorece la supervivencia de las células tumorales [371].

En nuestra muestra se ha hallado una correlación positiva entre los niveles de IL-6 y PCR. Esto se debe a que esta molécula se produce a nivel local en los estadios iniciales del proceso inflamatorio, viaja por el torrente sanguíneo e induce la síntesis de proteínas de fase aguda como la PCR en el hígado [372]. También produce la síntesis de heptacidina que bloquea la acción de la ferroportina 1 (transportador férrico a nivel digestivo) y, por esto, los procesos inflamatorios se asocian a anemia. En la médula ósea promueve la maduración de megacariocitos, lo que conduce a un aumento en la producción de plaquetas que se liberan al torrente sanguíneo, generando trombofilia. Todo esto coincide también con los datos hallados en nuestra muestra.

Aunque la detección de PCR está más extendida y por tanto es más accesible a nivel clínico, la medición de IL-6 ofrece como ventaja que pueden detectarse variaciones de la molécula entre 12 y 24h antes de que se produzca la elevación de PCR, además de que sus niveles son independientes de la función hepática.

Por otra parte, la IL-6 juega un papel importante en el desarrollo de la inmunidad adquirida, ya que estimula la maduración de las células T efectoras CD4⁺ a partir de los linfocitos *naïve* (y en menor medida los linfocitos CD8⁺ citotóxicos), así como la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Además, inhibe la diferenciación de linfocitos T reguladores [373].

Por el contrario, los metabolitos que inducen la diferenciación linfocitaria producen también otras moléculas que generan un

feedback negativo (ej. IL-4) para controlar la inflamación, y que al acumularse inducen la apoptosis de los linfocitos T o la acumulación de células supresoras derivadas mieloides. Con este proceso, a largo plazo, se ha descrito una correlación negativa entre los niveles de IL-6 y PCR y los niveles de linfocitos T, sobre todo del subtipo CD4⁺.

Es conocido que la linfopenia relacionada con los procesos inflamatorios (por infecciones víricas o cáncer, por ejemplo) se produce sobre todo a expensas de los linfocitos T CD4⁺, que son uno de los elementos principales en la inmunovigilancia tumoral, ya que viajan por el torrente sanguíneo con el objetivo de encontrar antígenos no propios [374]. Cuando esto ocurre, serán los responsables de activar a los linfocitos CD8⁺ para que actúen a nivel local en el microambiente tumoral realizando su actividad citotóxica. Por esto se ha postulado que la linfopenia de linfocitos CD4⁺ en sangre periférica (<500 céls/μl) constituiría un factor pronóstico en CPNM, sobre todo en estadios locorreionales [375], junto con niveles altos de PCR.

Las causas por las que disminuyen los linfocitos T CD4⁺ no son del todo conocidas, aunque se suponen múltiples [376]: por un lado, la presencia crónica de antígenos en los procesos inflamatorios produciría el agotamiento celular y la generación de linfocitos exhaustos; también la apoptosis o piroptosis de estas células por la tormenta de citoquinas que promoverían la muerte celular. Pero además, el descenso de linfocitos en sangre periférica podría deberse a que estas células estuviesen “secuestradas” en los tejidos donde se originó la inflamación, por lo que su nivel en sangre sería menor, mientras que a nivel

tisular el número de linfocitos CD4⁺ sería normal. Además, en el microambiente tumoral, debido a la acumulación de las células supresoras mieloides (mediada por IL-6 que se genera también en este medio) y otras células inmunosupresoras (como los macrófagos M2 o los linfocitos T reguladores) [377] se generan especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico y citoquinas antiinflamatorias, promotoras de la expresión de moléculas como PD-L1 o CD40 que, al unirse a sus receptores, inducen la anergia celular de los linfocitos, disminuyen su proliferación y la capacidad de presentación antigénica. Este proceso origina también un microambiente inmunosupresor que favorece la progresión tumoral.

No obstante, en nuestro estudio no pudimos hallar relación estadísticamente significativa entre los valores de IL-6 o PCR y alguna de sus subpoblaciones en sangre periférica de los pacientes con CPNM. Esto puede deberse al carácter transversal del estudio, y quizás mediante determinaciones seriadas de las subpoblaciones linfocitarias podría haberse observado esta transformación celular a subtipos efectores y finalmente, maduros o exhaustos. Podría ocurrir también, que estos cambios en la distribución de las subpoblaciones linfocitarias se produzcan en el microambiente tumoral y que fuese necesario el análisis de los linfocitos infiltrantes del tumor (TILs) para detectar estas diferencias.

Por último, en cuanto a la relación entre las subpoblaciones linfocitarias entre sí, los pacientes con mayores niveles de linfocitos CD8⁺ maduros, presentaban también niveles más elevados de linfocitos TEMRA, exhaustos y con diferenciación

terminal CD8⁺, pero esto no se correlacionó de forma significativa con la presencia de células maduras CD4⁺, lo que podría indicar que la maduración de estas dos subpoblaciones se produce en diferentes momentos y se ve influenciada por distintos factores. En cambio, los valores de linfocitos *naïve* CD4⁺ y CD8⁺, se relacionaron entre sí de forma directa. Esto resulta coherente, ya que la generación de células inmaduras para ambos subtipos celulares se produce de forma análoga [113], además de que la presencia de mayores niveles de células inmaduras implicaría una conservación de su producción y una menor exposición antigénica (de cualquier tipo) en el individuo.

5.2.3. Relación entre variables clínicas e inmunológicas y/o inflamatorias

5.2.3.1. Análisis de la edad

La única subpoblación celular en la que se han hallado cambios con la edad en esta muestra son los linfocitos CD8⁺ *naïve*. Esta población mostró una tendencia al descenso progresivo con la edad, aunque con una correlación leve-moderada que no nos permite obtener conclusiones definitivas, aunque coincide con lo descrito en publicaciones previas. Este hecho ha sido descrito anteriormente en población sana, aunque de forma más llamativa [194, 346] y, de hecho, es uno de los factores característicos de la inmunosenescencia.

En otras subpoblaciones celulares no hemos podido hallar ningún cambio significativo con la edad. Esto podría deberse,

por un lado, a que los cambios son lentos y progresivos, por lo que aunque existan tendencias en los cambios producidos con la edad, éstas no sean claramente manifiestas, y por tanto su relevancia clínica sería difícil de determinar, ya que se desconoce el impacto real que estos pequeños cambios progresivos en muchos subtipos celulares puedan tener en el funcionamiento global del sistema inmunológico, dada la alta complejidad del conjunto de elementos inmunes y los múltiples parámetros que lo conforman. Otra explicación podría ser la baja proporción de adultos jóvenes incluidos en nuestra muestra (porque el diagnóstico de cáncer de pulmón en <40 años es extremadamente raro), dado que los cambios más llamativos en cuanto al número o distribución de las subpoblaciones celulares podrían haber ocurrido a edades más precoces [378].

En cualquier caso, por los cambios descritos en población sana que se producen en el sistema inmune con la edad, decidimos buscar de forma individual el posible punto de corte de edad que nos permitiera detectar dos grupos con diferencias significativas en cada una de las subpoblaciones celulares estudiadas. El punto de corte de la edad para el análisis de los parámetros celulares de inmunosenescencia se ha determinado de forma relativamente arbitraria en diferentes publicaciones, y podemos encontrarla desde 50 hasta 70 años en función de la región [173, 211, 217, 291, 379–381], lo cual genera la necesidad de búsqueda de puntos de corte específicos. De hecho, en algunos casos se han empleado también franjas de edades en lugar de un único valor diferencial [381, 382].

En nuestro caso, buscamos el punto de corte de edad óptimo que nos permitiera maximizar la discrepancia entre las medias en el recuento y porcentaje de cada una de las poblaciones linfocitarias entre los dos grupos de edad que quedarían definidas por éste, y así, intentar determinar un punto de corte común que pudiera emplearse para todas las subpoblaciones linfocitarias o por grupos de ellas.

No obstante, no pudimos hallar un valor de edad diferencial común para todas las poblaciones y no en todas ellas se encontraron diferencias estadísticamente significativas al aplicar el punto de corte específico. Si bien es cierto que, en el caso de las subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺, el punto de corte era más alto para la mayoría de subpoblaciones (alrededor de 75-80, salvo en los linfocitos *naïve*), mientras que los puntos de corte para los linfocitos T CD4⁺, se encontraban alrededor de los 65 años para la mayoría de subpoblaciones (excepto en los *effector memory*).

En el caso de los linfocitos inmaduros (CD4⁺ y CD8⁺) el valor de edad diferencial se sitúa alrededor de los 65 años, lo cual confirma los resultados de publicaciones previas, que demuestran que aunque la involución del timo se produce en la adolescencia, los linfocitos *naïve* mantienen su diversidad hasta alrededor de la 5ª década de la vida, con un posterior descenso progresivo [383, 384]. Pero no sólo esto, sino que además, se ha demostrado que esta involución tímica es la que promueve también la diferenciación de los linfocitos inmaduros a estadios maduros en todo el compartimento CD4⁺ [385], aunque en etapas más tardías de la vida se mantienen más estables. Esto

explicaría que estas diferencias se encuentren en edades más tempranas que lo que ocurre en el compartimento CD8⁺.

Por otro lado, la diferenciación de los linfocitos CD8⁺ parece estar más influida por la estimulación antigénica (por ejemplo, por infecciones víricas crónicas) y por ello, las diferencias podrían encontrarse de forma más tardía y más profunda (65), aunque se han descrito resultados contradictorios [387]. Esta mayor influencia por los estímulos antigénicos, podría deberse a la presencia de CMH-I, que confiere capacidad citotóxica no necesariamente mediada por linfocitos CD4⁺ (mientras que éstos tienen condicionada su funcionalidad a la unión mediante CMH-II que sólo poseen las células presentadoras de antígeno). De todos modos, ambos mecanismos (y muchos otros) van a influir en la diferenciación tanto de linfocitos CD4⁺ como CD8⁺.

En la población de linfocitos T reguladores (CD4⁺CD25⁺) que, según los resultados de las publicaciones en población sana, tienden a aumentar con la edad [209, 352] (aunque pueden verse disminuidos en individuos ancianos con enfermedades autoinmunes), el punto de corte se ha situado también alrededor de los 65 años. En este caso, dada la involución del timo, no podemos decir que el supuesto aumento de este subgrupo celular esté relacionado con éste, sino con la proliferación de células T reguladoras ya presentes en el individuo. Se supone que el ambiente inmunológico del individuo con el paso de los años es el que promueve la proliferación de células T reguladoras en sangre periférica, además de que estas células poseen capacidad de resistencia a la apoptosis. De todos modos, en nuestra muestra, la tendencia que observamos

es a la disminución de los niveles de linfocitos T reguladores con la edad, lo que parece paradójico y opuesto a lo esperado. Esto podría ser secundario a la presencia del cáncer, favorecido por un predominio de estadios avanzados que podrían estar reclutando esta población celular al microambiente tumoral.

En cuanto a los linfocitos $\gamma\delta$, se ha observado que la expresión en superficie de CD57 y KLRG1 (marcadores de inmunosenescencia linfocitarios) aumenta en linfocitos $\gamma\delta$ VD1⁺VD2⁻ y VD1⁻VD2⁻, sobre todo en individuos con seropositividad para CMV [194], lo cual indica que estos subtipos celulares se afectan más por los procesos de inmunosenescencia. No obstante, queda por dilucidar en qué momento se inician estos cambios. Lo que sí se ha descrito es que la población VD2⁺ disminuye de forma significativa con la involución tímica (aunque preserva sus funciones), hecho que ocurre precozmente en la vida del individuo, mientras que la población VD1⁺ queda altamente preservada. Esto explicaría que en nuestra muestra, no hayamos encontrado un punto de corte significativo para la población VD1⁻VD2⁺ en los pacientes adultos, ya que dada la edad de desarrollo del cáncer de pulmón, no se han incluido niños ni adolescentes o adultos jóvenes.

Respecto al sistema inmune innato, los linfocitos NK mostraron como punto de corte 67 años. Cabe recordar que los datos de los que disponemos indican que el recuento de estas células aumenta con la edad, aunque globalmente su funcionalidad disminuye [191, 388]. Además, debido a su importante papel en la inmunovigilancia en los primeros estadios del desarrollo del cáncer, existe gran interés en conocer si la

evolución de estas células en el individuo puede ser uno de los factores que promueva el desarrollo del cáncer o, por el contrario, que sea el cáncer el que modifique la variabilidad de estas células (o incluso ambos).

Con todos estos datos, no podemos afirmar que exista un punto de corte común para las distintas poblaciones celulares incluso agrupándolas, pero realmente esto refleja la complejidad del sistema inmunológico así como su dinamismo, y tiene sentido que no podamos asumir que todas las poblaciones celulares se afectan por igual y en el mismo momento con el paso del tiempo. Otra posible explicación, es el impacto que pueda tener la presencia del cáncer en el individuo, y que hagan que las características inmunológicas de la población joven/anciana con CPNM sean distintas a las de la población sana, que ha sido mucho más estudiada. También puede ocurrir que esto impacte de forma distinta en los diferentes subtipos celulares.

5.2.3.2. Análisis del sexo

El análisis de la influencia del sexo biológico en los cambios que se producen en el sistema inmunológico es de gran interés, ya que es conocido que la incidencia de enfermedades autoinmunes es más elevada en mujeres, mientras que las enfermedades infecciosas en pacientes ancianos son más frecuentes en varones. No obstante, los resultados en cuanto a la distribución linfocitaria de hombres y mujeres no son del todo concluyentes [346].

De todos modos, sí parece haber consenso en referencia a que los cambios relacionados con la inmunosenescencia se producen de forma algo más tardía en mujeres y, confirmando nuestros resultados, existen datos previos que indican que las mujeres presentan niveles más elevados de linfocitos inmaduros. Por esto (entre otros factores), la mortalidad en pacientes que sufrieron infección por COVID-19 (lo que implicaba contacto con un patógeno “desconocido” para el organismo) fue menor en mujeres que en hombres [389].

5.2.3.3. Análisis de los parámetros pronósticos clásicos en cáncer de pulmón

La escala ECOG se ha relacionado en este análisis univariable con un patrón inflamatorio clásico: elevación de PCR e IL-6 así como de neutrófilos y bajos niveles de albúmina y linfocitos. Todos estos elementos se consideran factores pronósticos en cáncer de pulmón, y ya se ha mostrado previamente la relación entre el deterioro funcional, medido con la escala ECOG y la presencia de un estado de inflamación subyacente [390], concretamente, en pacientes con cáncer de pulmón localmente avanzado en nuestro medio [391].

Si consideramos las subpoblaciones celulares específicas, no se han encontrado referencias que las correlacionen con la situación funcional de los pacientes, si bien, sí se ha descrito que los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico y ECOG ≥ 2 presentan mayor tasa de linfopenia de CD4⁺ [375]. Nuestros datos son sumamente relevantes, puesto que ofrecen un marco

más detallado de cuáles son los subtipos linfocitarios CD4⁺ que más disminuyen con un estado funcional deteriorado en los pacientes con cáncer, de modo que muestran que los pacientes con ECOG 0-1 presentan niveles más elevados de LCM y LEM que los pacientes con ECOG ≥ 2 . Esto es destacable, ya que son las subpoblaciones con mayor capacidad de activación y rapidez de acción ante un estímulo. El hecho de que el *status* funcional influya en sus niveles lo convierte en un marcador muy prometedor como factor pronóstico y predictivo de respuesta y justifica su investigación en este contexto. Aunque esto no pudo ser confirmado en el análisis multivariable PCA, puede deberse a que, en este modelo, estas subpoblaciones de linfocitos CD4⁺ no tendrían tanto peso, y por tanto, no estarían incluidas en los componentes Dim1-4.

Del mismo modo que en nuestro estudio, en la publicación de Eberst *et al.* no se hallaron diferencias en el recuento de linfocitos CD8⁺ en función del estatus funcional. Este hecho concuerda con nuestros datos, ya que aunque los pacientes con ECOG 0-1 presentaban mayores niveles de linfocitos T CD8⁺ respecto a los pacientes con ECOG 2-3, el caso único con ECOG 4 presentaba niveles más altos que los dos grupos descritos previamente. Los datos son todavía más dispares para el subtipo LCM, por lo que no podemos extraer conclusiones a este respecto. De todos modos, como se expondrá de forma más exhaustiva a continuación, la funcionalidad principal de las células CD8⁺ se ejerce en el microambiente tumoral y puede que los cambios más evidentes se den a este nivel y no en sangre periférica.

Si el estudio de las subpoblaciones linfocitarias CD8⁺ y CD4⁺ es exigua en pacientes con cáncer, todavía es menor el conocimiento que se tiene en cuanto a la distribución de los linfocitos $\gamma\delta$ y su relación con características clínicas. La población mayoritaria en sangre periférica es precisamente la que presenta cambios significativos en función del *performance status* ($\gamma\delta 1^{-}\gamma\delta 2^{+}$), de modo que los pacientes con peor situación funcional (si excluimos el único paciente con ECOG4) presentan valores más bajos de este subtipo linfocitario. Es destacable que no hemos sido capaces de hallar cambios significativos de los niveles de $\gamma\delta 1^{-}\gamma\delta 2^{+}$ con la edad, pero sí con la situación funcional y esto podría suponer un cambio de paradigma en el estudio de los procesos de inmunosenescencia en los pacientes con cáncer, considerando el ECOG un parámetro que podría llegar a ser tan importante como la edad para su análisis. De nuevo, no pudimos corroborar este resultado en el análisis multivariable PCA por el bajo peso de estas subpoblaciones linfocitarias en dicho modelo.

Respecto al estadio tumoral, esta investigación confirma que tumores más avanzados se acompañan de un mayor grado de inflamación sistémica [391, 392] y, por tanto, niveles elevados de PCR, neutrófilos y plaquetas. Esto fue así en el análisis univariable, pero cuando consideramos todos estos parámetros juntos, en el análisis PCA, no pudimos hallar una correlación clara con los parámetros inflamatorios, lo que indica que incluso en enfermedades más avanzadas, podemos encontrar pacientes con distintos niveles de inflamación sistémica, y esto se ha visto relacionado con su pronóstico en diferentes estadios

[393, 394]. No obstante, no se encontraron relaciones significativas con subpoblaciones linfocitarias CD4⁺, CD8⁺ o $\gamma\delta$.

En cambio, se ha descrito, en una cohorte pequeña (de 24 pacientes) incluyendo distintos tumores torácicos (CPNM, CP microcítico y mesotelioma) frente a individuos sanos, una menor proporción de linfocitos CD8⁺ inmaduros y mayor de linfocitos maduros (CD28⁻CD57⁺) en los pacientes diagnosticados en estadio IV, mientras que los tumores localmente avanzados no mostraron diferencias tan llamativas con los individuos sin enfermedad neoplásica [395]. Esto, aunque interesante, debe interpretarse con cautela por el pequeño tamaño muestral, así como por la limitada representación de edad de los pacientes en dicho estudio (mediana 66 años, rango 56-66).

Por último, los hallazgos descritos en las subpoblaciones de células dendríticas son difícilmente interpretables, ya que, en el análisis univariable, los pacientes con estadio I presentaron niveles más bajos a los esperados respecto al resto de grupos por estadio, tanto de mDC como pDC. No obstante, el grupo de pacientes con estadio I es el menos representado en la muestra (4 pacientes, un 3% de los casos), por lo que los datos de este subgrupo podrían ser menos representativos de la población real. Si sólo tenemos en cuenta los pacientes con estadio II-IV, existe un descenso progresivo de los niveles de todos los subtipos de células dendríticas a medida que aumenta el estadio, predominantemente por niveles más elevados de células dendríticas en sangre periférica en los pacientes con estadio II frente a estadios más avanzados, tanto en el análisis univariable como en el PCA. Esto podría deberse al

desplazamiento de las DC desde la sangre periférica al microambiente tumoral (sobre todo en estadio localmente avanzado y metastásico), donde además tienen un papel inmunosupresor [396, 397].

Finalmente, aunque la situación nutricional también es un factor pronóstico clásico en cáncer de pulmón, dado que su evaluación comprende tanto características analíticas como clínicas, su discusión se realizará más ampliamente en el apartado 5.2.4, a continuación.

5.2.3.4. Análisis de otras características del tumor

La asociación entre los distintos subtipos histológicos de CPNM y la expresión de PD-L1 no ha podido determinarse, ya que los resultados en publicaciones previas han resultado contradictorios [398]. En nuestro caso, los tumores no clasificados como adenocarcinoma ni escamoso presentaban mayor expresión de PD-L1. Este dato debe tomarse con precaución ya que un porcentaje muy bajo de la muestra presentaban esta histología (3 pacientes). Debe tenerse en cuenta también en la bibliografía consultada, que en algunos estudios este subtipo histológico se clasificaba, junto con el adenocarcinoma, como carcinoma no escamoso. Además, la mayoría de los estudios de PD-L1 se realizan en pequeñas muestras histológicas de biopsia y, debido a la heterogeneidad inherente a los tumores, la expresión de PD-L1 en el global de la enfermedad podría ser distinta.

En cuanto a la relación entre los tumores escamosos y un nivel más bajo de linfocitos *naïve* CD8⁺, la histología podría actuar en este caso como un factor de confusión, ya que este grupo de pacientes tenía una mayor media de edad (72 frente a 66 años en el caso de la histología adenocarcinoma) y además, había un mayor porcentaje de varones (94.4 % vs 71.6%), y ya se ha detallado cómo estos dos factores se pueden relacionar con niveles más bajos de linfocitos inmaduros.

5.2.3.5. Análisis de la situación emocional y social

Las diferencias en la situación inmunitaria así como en la salud de los individuos se producen por múltiples elementos, y se han atribuido a factores genéticos, epigenéticos, sexo, exposición ambiental a antígenos / contaminación, actividad física, condiciones sanitarias del entorno y al *status* socioeconómico. No obstante, la evaluación del impacto de la situación socioeconómica supone un reto debido a los múltiples factores que la integran, así como a las diferencias inherentes a la región geográfica y social en la que vive el individuo.

En nuestro estudio, no se ha encontrado relación entre la valoración social y emocional (ansiedad-depresión) de los pacientes <70 años. En cambio, en los pacientes ancianos, el diagnóstico de sospecha de depresión (en el cuestionario de ansiedad-depresión) se acompañó de niveles más elevados en sangre de linfocitos CD8⁺ exhaustos, aunque no en la valoración de Yesavage. Esto no pudo confirmarse en el análisis

multivariable (PCA), considerando de forma conjunta varias subpoblaciones de linfocitos CD8⁺.

La literatura al respecto ha asociado el diagnóstico de depresión mayor y el riesgo de suicidio con niveles elevados de linfocitos T *helper* (CD4⁺) de memoria, aunque las subpoblaciones de linfocitos CD8⁺ han sido menos estudiadas [399]. Por otro lado, el desarrollo de la depresión se ha relacionado con un sustrato inflamatorio a nivel local y sistémico [400, 401], sobre todo en el contexto de factores estresantes. El ambiente inflamatorio, así como la alteración en la producción de cortisol, es capaz de alterar la respuesta inmune directamente, pero también indirectamente, favoreciendo la infección por CMV. De hecho, la relación entre la presencia de traumas vitales (principalmente en la infancia [402]) y el estrés crónico y el riesgo de infección por CMV (y de reactivaciones del mismo) ha sido ya establecida sobre todo en población anciana, y esta infección promueve la acumulación de linfocitos T diferenciados (como los CD8⁺ exhaustos). Pero es que además, en este entorno dichos cambios de inmunosenescencia no se atribuyen solamente a la presencia de CMV, sino a la interacción entre ésta y la presencia de estrés psicosocial [403, 404].

No puede determinarse por qué no se asoció al aumento de otras subpoblaciones diferenciadas; no obstante, nos da una señal para profundizar en la influencia de la situación emocional sobre el sistema inmune. Quizás empleando valoraciones psicológicas / psiquiátricas más profundas (que sobrepasan el objetivo del presente estudio) se podrían obtener datos

más sólidos sobre el impacto de la depresión en otras poblaciones linfocitarias.

En cambio, encontramos que los pacientes ancianos con situación social más desfavorable (medida con la escala de Gijón) presentaban niveles más bajos de linfocitos CD8⁺ maduros en el análisis univariable y, en general, de otras subpoblaciones diferenciadas de linfocitos CD8⁺ en el análisis PCA (efectores terminales, exhaustos). No se ha publicado bibliografía específica al respecto, y los datos que hacen referencia a la situación psicosocial o laboral son contrarios a estos hallazgos. Al tratarse de datos aislados no se pueden extraer conclusiones definitivas pero sí invitan a realizar estudios que incluyan estas variables.

5.2.3.6. Análisis específico de la población anciana incluyendo la valoración geriátrica integral

En el análisis univariable el hallazgo más llamativo es la relación encontrada con los niveles de linfocitos T reguladores. Uno de los elementos que definen el proceso de inmunosenescencia es la acumulación de linfocitos T reguladores, aunque esto no se ha podido correlacionar con la edad en nuestra muestra. Además, las relaciones encontradas con parámetros de la valoración geriátrica son opuestas a las esperadas: los pacientes con dependencia para la realización de tareas instrumentales (medida con el cuestionario de Lawton-Brody), con resultado alterado en el cuestionario de Pfeiffer y con limitación para la movilidad moderada o severa,

presentaban niveles más bajos en sangre de linfocitos T reguladores que su grupo comparador (considerado “normal”). Esto no fue confirmado en el análisis multivariable PCA, pero debemos recordar que en este caso, los linfocitos T reguladores se situaban en el gráfico directamente relacionadas con otras subpoblaciones de linfocitos CD4⁺ (como los *naïve*) y las células dendríticas mieloides, con las que no pudimos encontrar relación con la situación cognitiva en el análisis univariable.

El motivo de este hallazgo en cuanto a los linfocitos T CD4⁺ reguladores nos es desconocido, aunque ya se han publicado resultados también paradójicos en el estudio de la situación cognitiva: por ejemplo, se describieron niveles más elevados de linfocitos T reguladores en individuos con deterioro cognitivo leve respecto a pacientes con enfermedad de Alzheimer [405], lo cual resulta contradictorio, aunque podría deberse al “secuestro” de estas células a nivel del sistema nervioso central. De todos modos, en nuestro estudio no se pudo realizar la medición de los niveles de linfocitos T reguladores en todos los pacientes por problemas metodológicos ya descritos previamente, por lo cual todos estos datos deben interpretarse con precaución.

Además de esto, parece que las subpoblaciones más relacionadas con las alteraciones cognitivas son los linfocitos B y linfocitos CD4⁺, pero no pudimos hallar relación con estas variables. En este sentido, se ha demostrado en ratones que el déficit de linfocitos T (principalmente CD4⁺) se relacionan con alteraciones en el hipocampo que influyen en la memoria (tanto primaria como durante la edad adulta y la vejez) y mejoran con

la reconstitución del compartimento CD4⁺ (pero no con otras poblaciones celulares), lo que supone la base biológica que confirma la relación con patrones de linfocitos CD4⁺ compatibles con características definitorias de inmunosenescencia en adultos con fallos cognitivos [406].

En cambio, la alteración en la situación cognitiva determinada mediante Pfeiffer se correlacionó con ratios CD4⁺/CD8⁺ más bajas, lo cual sí que está en consonancia con publicaciones previas [407, 408]; así como menores niveles de linfocitos CD8⁺ CM. Estos datos no pudieron confirmarse en el análisis univariable con el mini-mental test de Lobo; en cambio, en el análisis multivariable PCA, no pudimos encontrar una agrupación de pacientes con similares características inmunológicas en función de la clasificación por el resultado del cuestionario de Pfeiffer, pero sí lo encontramos con el test mini-mental, con resultados que van en consonancia con los encontrados previamente para el test de Pfeiffer: los pacientes con sospecha de deterioro cognitivo mediante el test de Lobo presentaban niveles más bajos de linfocitos CD8⁺ así como de casi todas sus subpoblaciones.

Aunque estos resultados no permiten obtener conclusiones definitivas debido al bajo número de pacientes que tenían alteración en el test mini-mental (2/52), sugieren la conveniencia de desarrollar líneas de investigación que tengan en cuenta la situación cognitiva de los pacientes con cáncer, en el estudio del sistema inmunológico. De todos modos, esto es complejo, ya que los pacientes con deterioro cognitivo no suelen ser candidatos a abordajes diagnósticos o terapéuticos agresivos,

pero sí podrían serlo aquellos pacientes con deterioro cognitivo incipiente. En éstos, sería interesante realizar estudios más exhaustivos para conocer tanto sus características clínicas como inmunológicas, que nos podrían ayudar a tomar decisiones clínicas más acertadas, evitando exploraciones y tratamientos fútiles.

No hemos podido identificar relación entre las variables celulares y la valoración de la dependencia para actividades básicas, que es un claro factor de fragilidad, y que se ha asociado con niveles bajos de CD4⁺ *naïve* y altos de CD8⁺ EM [409]. Pero debe tenerse en consideración que muy pocos de nuestros pacientes se presentaban con dependencia moderada o severa (3/59), ya que la mayoría de estos individuos con vulnerabilidad no llegan a completar el estudio diagnóstico ante una sospecha de neoplasia, dada la imposibilidad para ofrecerles algún tratamiento.

El término polifarmacia hace referencia a la toma de medicaciones múltiples, siendo algunas médicamente fútiles, que pueden conllevar interacciones medicamentosas, empeoramiento de la cumplimentación y riesgo de caídas [410]. Se ha intentado definir numéricamente, aunque no hay consenso al respecto [411], por lo que en nuestro caso, agrupamos a los pacientes con dos puntos de corte: ≤ 3 fármacos, 4-5 fármacos o >5 . En nuestro estudio, observamos una leve señal de relación con los parámetros de inmunosenescencia, ya que, en el análisis univariable, los pacientes que tomaban 4 fármacos o más, presentaban niveles más altos de linfocitos CD4⁺ EM. Esto no ha sido descrito

previamente y es especialmente importante en pacientes con CPNM que probablemente recibirán tratamiento para el control de síntomas, además de tratamiento oncológico activo, que puede incluir la inmunoterapia. Sería interesante desde este punto de partida confirmar estos resultados en poblaciones más numerosas, determinar la influencia de distintos grupos farmacológicos, así como observar el impacto de la intervención geriátrica mediante la adecuación y simplificación de la prescripción para cada paciente.

Del mismo modo que observamos en los pacientes con ECOG deteriorado, los pacientes considerados vulnerables o frágiles según la valoración SIOG1 presentaron niveles de linfocitos T $\gamma\delta$ más bajos. Este es el cambio más conocido de los linfocitos T $\gamma\delta$ relacionado con la inmunosenescencia [354], pero su conexión con factores clínicos no había sido descrito hasta el momento.

En cambio, ninguna población celular pudo relacionarse con la clasificación de Balducci, con lo que nuestros datos apoyan que, SIOG1 podría tener mayor aplicación en la clasificación geriátrica de pacientes con CPNM [266]. Dado que las subpoblaciones de linfocitos $\gamma\delta$ tenían menos peso en el modelo PCA, no pudo determinarse si existía relación de estas poblaciones con la clasificación geriátrica en este análisis multivariable.

Finalmente, otra relación relevante encontrada con los parámetros de la VGI fue con parámetros inflamatorios. Esto concuerda con publicaciones muy recientes, en las que se

describe que los pacientes frágiles no presentan características inmunológicas distintas a los considerados no frágiles, si se analizan sus poblaciones linfocitarias [412].

Incluso en los estudios en los que se han encontrado correlaciones, éstas han sido contradictorias u opuestas a los resultados esperados [413]. Además de esto, los análisis en los diferentes estudios son heterogéneos, empleando en la mayoría el valor de los linfocitos totales y, en algunos, los valores de las subpoblaciones básicas (linfocitos T CD4⁺, CD8⁺, B y NK), lo que podría explicar la variabilidad de los resultados.

No obstante, estos pacientes sí presentan niveles mayores de citoquinas proinflamatorias (principalmente IL-6) y de PCR, que indicarían un grado de inflamación subyacente [412, 414]; estos datos apoyan el papel del *inflammaging* en el desarrollo de fragilidad en pacientes ancianos. En concreto, algunos de estos datos proceden de un estudio español, publicado por *Marcos-Pérez et al.* en 2018, lo cual es relevante, ya que la mayoría de estas investigaciones se han realizado en población asiática. Por otro lado, en el caso de los pacientes con cáncer de pulmón esto no había sido explorado previamente. De hecho, en los estudios publicados hasta el momento, se han excluido los pacientes diagnosticados de cáncer.

5.2.4. Relación entre la valoración nutricional y parámetros inflamatorios e inmunológicos

La albúmina es el parámetro nutricional analítico por excelencia, debido a su producción hepática, que resulta

disminuida cuando existe un déficit nutricional. No obstante, su síntesis también puede ser desplazada cuando se han de producir otras sustancias en este mismo órgano, como la PCR en respuesta al estímulo de la IL-6, que se genera en contextos proinflamatorios [373] como se ha descrito previamente. Por esto resulta coherente que, en nuestro estudio, hayamos encontrado una relación inversa entre los niveles de albúmina y PCR así como de la IL-6.

También los niveles de neutrófilos eran mayores en pacientes con niveles más bajos de albúmina, al contrario de lo que ocurre con los linfocitos (especialmente los linfocitos T). Pero precisamente por la influencia de la presencia de inflamación sistémica con la producción de proteínas a nivel hepático, la valoración nutricional de los pacientes no puede basarse exclusivamente en parámetros analíticos como la albúmina o la prealbúmina [415], sino que deben tenerse en consideración factores como el IMC, la pérdida de peso, la evaluación mediante escalas (MNA) y la clasificación nutricional.

En cuanto a la valoración nutricional, debido al componente inflamatorio de la caquexia cancerosa, es altamente frecuente en estos pacientes, la elevación de IL-6 y de reactantes de fase aguda como PCR así como la presencia de hipoalbuminemia. Se ha descrito ya previamente cómo este proceso genera también neutrofilia, anemia y linfopenia. Por eso, los pacientes de esta muestra que se diagnosticaron de caquexia y precaquexia, tenían niveles más altos de IL-6, PCR y también de neutrófilos, así como niveles menores de albúmina, hemoglobina y linfocitos, frente a los que presentaban valoración

nutricional normal en el análisis univariable. En el PCA destacó que la mayoría de pacientes con situación nutricional normal no presentaban ninguna de estas alteraciones analíticas.

Por otro lado, la obesidad induce también la producción de IL-6, ya que activa y atrae células inmunes al tejido adiposo, que también sintetizan esta molécula incrementando así su nivel en sangre periférica y dando lugar a la inflamación crónica asociada a la obesidad [372]. Como se ha detallado, en el extremo opuesto, la caquexia (y precaquexia) constituye una situación catabólica con importante componente inflamatorio, como observamos en la población analizada en este estudio; pero en los pacientes obesos puede darse también un estado de malnutrición. De todos modos, en nuestro estudio no queda claramente definida la población con obesidad sarcopénica, dado que no se pudieron medir parámetros musculares necesarios como la fuerza muscular, masa magra u otros marcadores de sarcopenia. Estos parámetros no fueron incluidos porque estas determinaciones no se realizan en la práctica clínica habitual y son de difícil implantación en las consultas de oncología.

En referencia a la relación de los parámetros nutricionales con variables inmunológicas, destacan, en el análisis univariable, los niveles elevados de linfocitos B en pacientes caquéticos respecto al resto (población con situación nutricional normal o con sospecha de precaquexia). Aunque este hecho no ha sido descrito previamente en la bibliografía, sí se ha encontrado en pacientes con caquexia cancerosa un aumento del factor activador de las células B (BAFF), que es una

proteína de membrana presente en múltiples órganos (como el tejido adiposo) pero que puede liberarse de forma soluble. Su expresión aumenta como respuesta a IFN- γ y β , y produce una activación de los linfocitos B, pero también activa vías proinflamatorias a través de NF- κ B, descrito también en el contexto de la evolución de tumores sólidos [416]. Además de generar un ambiente proinflamatorio, induce la resistencia a la insulina, lo cual corrobora su relación con el desarrollo de la caquexia asociada al cáncer y se ha relacionado también con la progresión tumoral. La presencia de esta molécula podría explicar la relación entre el hallazgo de caquexia y niveles elevados de linfocitos B en sangre periférica.

Respecto a los linfocitos T, se ha hallado en el estudio univariable una disminución tanto de los niveles de linfocitos T CD8⁺ globales (sin poder correlacionar con ninguna subpoblación específica), como de los linfocitos T CD4⁺ maduros (CD27⁻CD57⁺) en los pacientes con caquexia, aunque en el análisis multivariable esto fue de difícil interpretación ya que se incluían múltiples subtipos celulares considerados conjuntamente. Recientemente se ha descrito la posible correlación entre la presencia de linfocitos CD8⁺ inmaduros y efectores de memoria (tanto sangre periférica como en biopsias musculares) con una mayor masa muscular en pacientes con cáncer. En cambio, la abundancia de linfocitos T reguladores se ha correlacionado de forma negativa con la masa muscular, aunque estas subpoblaciones concretas no mostraron relación con la situación nutricional de nuestros pacientes [417].

Estos datos sugieren que la respuesta inmune que depende de los linfocitos CD8⁺ ejercería un papel protector contra el catabolismo muscular en los pacientes con cáncer, aunque el papel de los linfocitos CD4⁺ (excepto los T reguladores) no ha podido ser dilucidado. Por ejemplo, en pacientes con tumores gastrointestinales se ha descrito relación entre niveles bajos de linfocitos T reguladores y mayor índice de masa magra, pero también, niveles mayores de CD4⁺ en pacientes con mayor deterioro funcional, lo cual parece contradictorio [418]. De todos modos estos datos deben interpretarse con prudencia, dada la escasa muestra analizada (11 pacientes) y la ausencia de representación de otros subtipos de cáncer.

En el *screening* nutricional mediante la escala MNA los pacientes jóvenes que presentaban un test alterado tenían niveles más bajos de linfocitos CD4⁺ EM (que están en proceso de maduración a estadios terminales pero son todavía activos), pero curiosamente también de linfocitos T reguladores y del subtipo $\gamma\delta$ V δ 1-V δ 2⁺, lo cual no puede explicarse fácilmente con los datos con los que contamos hasta el momento y tampoco ha podido confirmarse en el grupo de pacientes ancianos. De todos modos, se ha demostrado por ejemplo, que la caquexia asociada a procesos infecciosos presenta mecanismos subyacentes distintos (con un papel todavía más importante de los linfocitos CD8⁺ a nivel del tejido adiposo, mediados por IFN-1 y no por citoquinas como IL-6 y TNF) [419], y este hecho nos insta a investigar de forma más profunda las posibles diferencias que podrían encontrarse entre los distintos procesos de inflamación crónica, y dentro de la caquexia cancerosa, incluso

las posibles disparidades entre distintos subtipos tumorales, aunque compartan su componente catabólico.

5.2.5. Relación entre la infección por CMV y parámetros inflamatorios e inmunológicos

Existen múltiples referencias bibliográficas en las últimas dos décadas que relacionan la seropositividad para CMV y la acumulación de subpoblaciones linfocitarias más diferenciadas, principalmente en el subgrupo de linfocitos CD8⁺, pero también CD4⁺. Esto se ha estudiado sobre todo en población anciana sin enfermedades neoplásicas [420], pero también en población más joven se han podido detectar estos patrones celulares [219, 221]. Estos datos han sido los más consistentes en nuestro estudio, tanto en el análisis univariable como en el multivariable PCA, mostrando a la infección por CMV como uno de los principales factores de inmunosenescencia en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico. Este hecho es debido a que la presencia del CMV en el individuo inmunocompetente obliga a una inmunovigilancia constante, que estimula la diferenciación de los linfocitos T (principalmente CD8⁺) y promueve la pérdida de expresión de CD27 y CD28, generando subpoblaciones más maduras [421].

Aunque en algunos estudios se han descrito también niveles más bajos de los linfocitos inmaduros en los pacientes con exposición a CMV (y sobre todo con infección persistente), este hallazgo no ha sido confirmado en nuestra muestra. Esto podría deberse, al menos en parte, a la baja tasa de pacientes que no

habían estado expuestos a CMV (<15%), lo que podría provocar que diferencias menos llamativas no fuesen detectadas. También es posible que, en los pacientes con cáncer, no existan diferencias significativas en el subgrupo de linfocitos *naïve*, además de que estos hallazgos, incluso en población no oncológica, son menos consistentes que los descritos para las poblaciones más diferenciadas, y se cree que la disminución de esta población se debe principalmente a la involución tímica y aunque influyen otros factores, la infección por CMV no se considera un factor relevante en este caso.

Los niveles de linfocitos $\gamma\delta$ $V\delta 1^+V\delta 2^-$ se mostraron elevados en este estudio, lo cual está en consonancia con otras publicaciones previas, ya que son los linfocitos $V\delta 2^-$ (dentro del subgrupo $\gamma\delta$) los más implicados en el control de la infección por CMV [224]. Por este motivo, en los pacientes seropositivos para CMV, se encuentra en sangre periférica niveles elevados de linfocitos $V\delta 2^-$, sobre todo de fenotipos más diferenciados (hecho que no se produce en pacientes sin infección por CMV independientemente de la edad).

Por último, la correlación con los niveles totales de los linfocitos NK y la presencia de CMV no está del todo establecida, aunque sí queda claro, que existe una expansión de linfocitos NK más diferenciados ($CD56_{dim}^+ CD16^+$). Esto no ha sido investigado en este estudio [422], aunque parece que los principales cambios en los linfocitos NK son mediados por la edad, más que por la infección por CMV [362].

En cualquier caso, la presencia de anticuerpos IgG anti-CMV no puede distinguir entre una infección persistente con o sin reactivación subclínica de la misma [423], pero los efectos sobre el sistema inmunológico de estas entidades son distintos, ya que en la reactivación existe una estimulación más potente del sistema inmunológico. Esto podría incluso ser diferente también en función de los niveles de anticuerpos detectados, que se relacionarían con el control del crecimiento del virus [219] o con el tiempo transcurrido desde que se adquirió la infección. De todos modos, esto no ha sido analizado, ya que sobrepasa el objetivo de este estudio.

5.3. Asociación de los patrones inmunológicos obtenidos mediante “clustering” con parámetros clínicos

El análisis mediante técnicas de *clustering* permitió obtener 9 grupos de pacientes que compartían características inmunológicas. De entre ellos, destaca el *cluster* 6, que, aunque formado por pocos pacientes, presentó un marcado patrón proinflamatorio, con importante neutrofilia y trombofilia así como linfopenia de prácticamente todas las subpoblaciones estudiadas. Este patrón además, fue exclusivo de la población joven con una situación funcional deteriorada y se acompañaba de elevación de IL-6 y PCR así como de niveles bajos de albúmina. Estos pacientes parecían también tener una tendencia a haber padecido una pérdida de peso más llamativa en los últimos meses. Todos estos datos apoyan los resultados

que se habían obtenido previamente, que correlacionaban un estado proinflamatorio con un peor estado funcional así como con una peor situación nutricional [390]. No obstante, llama la atención la ausencia de pacientes ancianos en este grupo, ya que, aunque no se ha estudiado de forma sistemática la situación inflamatoria/inmunológica de los pacientes ancianos con cáncer de pulmón, en las últimas publicaciones, se ha descrito, en los pacientes ancianos, una tendencia a presentar tumores más indiferenciados [424], y estos suelen presentar una evolución con un deterioro más rápido del estado funcional y por tanto ECOG más elevado. El por qué no hemos encontrado pacientes ancianos en este subgrupo no parece que se deba a que este patrón inflamatorio esté relacionado con la edad sino, probablemente, a que estos pacientes no habrían completado el proceso diagnóstico ante la sospecha de cáncer de pulmón, ya que además de un estado funcional deteriorado, en muchos casos se asociarían comorbilidades que inducen a evitar exploraciones fútiles.

En cuanto al resto de *clusters*, sólo se pudo correlacionar la edad con los grupos 1, 2, 4 y 8. En el *cluster* 1, caracterizado por niveles mayores de linfocitos T $\gamma\delta$ V δ 1⁺V δ 2⁻, CD4⁺ EM y CD4⁻ CD8⁻ se relacionó en la agrupación edad-ECOG con un predominio de pacientes jóvenes con buena situación funcional. La relación de los linfocitos CD4⁺ EM y el ECOG ya había sido descrita en el análisis univariable en este trabajo, y con este nuevo dato, podemos afirmar que esto se da principalmente en los pacientes jóvenes con CPNM, mientras que esta relación no se había observado para los linfocitos T $\gamma\delta$ V δ 1⁺V δ 2⁻, cuya

relación principal se ha establecido con la exposición a CMV. Puesto que este parámetro no se ha analizado conjuntamente con la agrupación variable-ECOG, no podemos conocer el impacto de este factor; no obstante, sí sabemos que todos los pacientes integrantes del *cluster* 1 presentaban infección previa por este virus. Por último, la función de los linfocitos T CD4⁺CD8⁻ (también denominados doble negativos) no es del todo conocida y, de hecho, se han descubierto ya subpoblaciones con funciones reguladoras, proinflamatorias y relacionadas con la autoinmunidad; en el contexto del cáncer parece que podrían tener un papel tumorigénico o antitumoral dependiendo del subtipo tumoral así como del microambiente, y pero está definido su papel en cáncer de pulmón [425].

El grupo 4, caracterizado por el predominio de todas las subpoblaciones de células dendríticas se observaba fundamentalmente en pacientes jóvenes. En población sana, los niveles de células dendríticas no disminuyen con la edad aunque sí parece disminuir su funcionalidad, además de que se modifica su distribución, aumentando sobre todo las células de perfil inflamatorio (CD16⁺) [190]. Con estos datos, no podemos concluir que los niveles de células dendríticas disminuyan con la edad, pero sí que existen un subgrupo de pacientes jóvenes que presentan este perfil inmunológico, que es menos frecuente en pacientes ancianos.

El hecho opuesto ocurre en el *cluster* 2, que se observó principalmente en población de 70 años o más. No obstante, en este grupo no destacaba ninguna de las poblaciones analizadas. Solamente los linfocitos T $\gamma\delta$ V δ 1⁺V δ 2⁻ eran discretamente

mayores y los linfocitos CD4⁺ (fundamentalmente inmaduros) eran ligeramente más bajos; no obstante, estas variaciones eran clínicamente poco relevantes.

Por último, el patrón del grupo 8 se caracterizaba sobre todo por niveles más elevados de linfocitos CD4⁺ maduros y TEMRA, y se halló fundamentalmente en pacientes ancianos con ECOG 0-1. Este patrón sí se ha descrito en pacientes ancianos sin cáncer como marcador de inmunosenescencia (aunque es más conocido para la población CD8⁺) [215]; además, en este *cluster* predominaba también la población doblemente positiva (CD4⁺CD8⁺), cuyos niveles también aumentan con la edad, sobre todo relacionado con la involución tímica [426]. De nuevo, no podemos afirmar que niveles elevados de linfocitos T CD4⁺ más diferenciados se relacionen con edades más avanzadas, pero sí que el patrón descrito se detecta con mayor frecuencia en pacientes con CPNM de 70 años o más.

El resto de parámetros clínicos no mostraron relación con ninguna de las agrupaciones inmunológicas. En especial, en la población anciana, no se pudo hallar relación con ninguna de las escalas empleadas para evaluar las distintas esferas de la VGI. Este hecho podría obedecer a distintos motivos: por un lado, algunos de los *clusters* incluían muy pocos pacientes ≥ 70 años, por lo que tuvieron que excluirse del análisis; además, en los *clusters* que se pudieron analizar también el tamaño de la muestra era escaso, por lo que las conclusiones no pueden ser definitivas al respecto.

Otro posible motivo de la ausencia de correlación con variables clínicas en este grupo de pacientes se fundamentaría en que los subtipos celulares con más peso en cada uno de estos *clusters* podrían no ser aquellos más influidos por las características clínicas estudiadas. Por ejemplo, en el análisis univariable encontramos que los niveles de linfocitos T reguladores se correlacionaban con la situación cognitiva o la capacidad funcional medida con el cuestionario SPPB; no obstante, los niveles de linfocitos T reguladores no fueron los más destacables en ninguno de los grupos obtenidos mediante *clustering* (sólo se presentaron discretamente elevados en el grupo 5). De todos modos, ya se ha descrito previamente que la situación inmunitaria de los pacientes ancianos no muestra claras diferencias entre los individuos considerados frágiles, mediante valoración geriátrica, frente a los no frágiles, mientras que estos últimos, sí presentan menores niveles de inflamación sistémica [412].

5.4. Fortalezas, debilidades y oportunidades

5.4.1. Fortalezas del estudio

En primer lugar, este estudio aporta valor al conocimiento que se tiene del sistema inmunológico de los pacientes con cáncer de pulmón, dado que, hasta el momento, es la serie más amplia de pacientes diagnosticados de CPNM con un estudio exhaustivo de las distintas subpoblaciones de linfocitos T, así como de los subtipos de células dendríticas. Este estudio se ha

realizado además en población no asiática, en la que todavía existen menos datos en cuanto a las características inmunológicas y su relación con variables clínicas. El hecho de incluir únicamente un subtipo de pacientes con cáncer de pulmón favorece el análisis de una población más homogénea (respecto a otros estudios que incluyen pacientes con distintos tipos de neoplasias de base).

Así mismo, esta valoración del sistema inmune se ha realizado mediante citometría de flujo, que es una técnica ampliamente extendida a nivel hospitalario, por lo que podría aplicarse fácilmente a la práctica clínica habitual, simplemente incluyendo los reactivos necesarios para la valoración de las poblaciones celulares que sean de interés.

También cabe destacar que en todos los pacientes de 70 años o más se ha realizado una valoración de las múltiples esferas que pueden afectar a su situación basal y a las decisiones terapéuticas en la práctica clínica. Tanto la situación nutricional como funcional e independencia, cognitiva, emocional, social y comorbilidad. También en los pacientes jóvenes se valoraron características nutricionales, emocionales y sociales. Todo esto, proporciona una valoración clínica completa, que puede aplicarse fácilmente en la práctica clínica habitual.

En cuanto a la metodología del estudio, al tratarse de un estudio transversal con inclusión prospectiva, existen pocos datos faltantes para la realización del análisis estadístico (salvo en la subpoblación de linfocitos T reguladores, como se

expondrá después). Además, la técnica de citometría de flujo fue realizada por las técnicas auxiliares del servicio de Hematología, con larga experiencia en el manejo de dichas muestras, anticuerpos y dispositivos necesarios para el estudio inmunitario. Por otro lado, el análisis e interpretación de los resultados de citometría de flujo fue realizada por una única investigadora (la doctoranda), con la supervisión de especialistas en Hematología cuya actividad asistencial incluye la interpretación de citometría de flujo. Esto garantiza la uniformidad en el análisis e interpretación de los datos.

5.4.2. Limitaciones del estudio

No obstante, existen también circunstancias que pueden limitar el valor de los resultados presentados, que serán detalladas a continuación.

Por un lado, se trata de un estudio realizado en un solo centro y, por tanto, con un tamaño muestral relativamente limitado. Esto podría haber afectado a la potencia del estudio, y supondría que los datos fuesen más difícilmente extrapolables. No obstante, cabe destacar que las características de los pacientes descritas, son bastante concordantes con los datos en pacientes con CPNM descritos en la literatura.

Por otro lado, se trata de un estudio transversal, que no permite valorar la evolución de las poblaciones linfocitarias y otros parámetros inmunológicos e inflamatorio en un mismo individuo con el paso del tiempo. Del mismo modo, no se ha podido correlacionar la situación inmunológica e inflamatoria en

sangre periférica con el infiltrado inmunológico tumoral. Aun así, este no era el objetivo del estudio, ya que esto es mucho más difícil de aplicar en la práctica clínica habitual, debido a que en la mayoría de casos de CPNM, las muestras histológicas proceden de biopsias, con escaso material para el diagnóstico, lo cual limita la realización de un mayor número de técnicas para caracterizar el microambiente tumoral.

En cuanto a la inclusión de pacientes, cabe resaltar que los pacientes muy frágiles, tanto por comorbilidad, como por situación funcional (con ECOG 4) habitualmente no llegan a completar el proceso diagnóstico de cáncer y por tanto no son remitidos al servicio de oncología médica, por lo que sólo un paciente con estas características fue incluido en este estudio. Esto supone que no hemos podido analizar la situación inmunológica de los pacientes más deteriorados. Además de esto, el reclutamiento de pacientes tuvo que suspenderse en 2021 por las dificultades acaecidas en el contexto de la pandemia por Sars-CoV-2, así como por el desconocimiento del impacto de dicha infección en el sistema inmunológico de los nuevos pacientes incluidos.

De todos modos, en 2020 se realizó ya un análisis exploratorio con los pacientes incluidos hasta ese momento, y confirmamos que existía una probabilidad muy baja de encontrar diferencias superiores al 10% en la variable principal (linfocitos CD3⁺ CD57⁺ CD27⁺) estadísticamente significativas entre la población de pacientes jóvenes vs. ancianos diagnosticados de cáncer de pulmón no microcítico. Esto sugiere que la edad por sí misma no es el único factor con impacto en el estado

inmunitario de los pacientes, ya que la población anciana (y en especial, los pacientes ancianos con cáncer), está integrada por un grupo poblacional muy heterogéneo. Por tanto, concluimos que el tamaño muestral calculado inicialmente, basado en características de población sin cáncer, no es extrapolable a nuestra muestra. Por estos motivos se decidió cerrar el estudio en 2021 cuando se contaba con 131 pacientes.

Por último, el análisis de todas las subpoblaciones de T reguladores pudo realizarse en alrededor de un 30% de la muestra global por problemas metodológicos (de hecho, por eso no pudo determinarse el papel en población anciana). Inicialmente (siguiendo las instrucciones de Beckman Coulter) se estaba empleando el permeabilizador PerFix® para la determinación de FoxP3, que es un marcador intracelular. Cuando se realizó el análisis intermedio sobre los primeros 90 pacientes incluidos, se encontró que la población de linfocitos CD4 *helper* era difícilmente identificable con los marcadores intracelulares, ya que la adquisición de estas células era menor a la esperada. Se hizo una investigación más profunda en cuanto a este subtipo celular y las formas de identificación. Por tanto, tras una búsqueda bibliográfica, se probaron los tampones de tinción FoxP3/Transcription Factor eBioscience™ en 5 muestras y se comprobó que este permeabilizador, más específico para FoxP3, detectaba estas células con mayor sensibilidad y por tanto, había una mayor adquisición de células mediante citometría de flujo.

Por otro lado, existe otra forma de detección de las células T *helper*, mediante el marcador de superficie CD127, que ya

estábamos empleando, por lo que el cambio del permeabilizador, nos aportó una nueva forma de detección de este subtipo celular con mayor precisión. Este hecho supone que, para analizar los linfocitos T reguladores de la muestra total, nos limitásemos al uso de la población CD4⁺CD25⁺; mientras que el análisis de una población que es algo más representativa de los linfocitos T reguladores (CD4⁺CD25⁺CD127^{low}) sólo pudo completarse en 98 pacientes (de los 131). Por último, las subpoblaciones de T reguladores, empleando marcadores como FoxP3 sólo se han analizado en 47 pacientes (en los que se ha podido emplear el segundo permeabilizador). Por esto el análisis de la población en la que pudo realizarse el estudio completo de linfocitos T reguladores se detalla por separado y, en el análisis global sólo se incluyen los linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺.

5.4.3. Oportunidades

La combinación de los parámetros clínicos junto con los analíticos permite una valoración mucho más exhaustiva de los pacientes con CPNM. Una vez conocidas las características basales de los pacientes con CPNM sería de interés analizar su impacto pronóstico en diferentes estadios así como su posible papel predictivo de respuesta, sobre todo en los tratamientos que incluyen inmunoterapia. Esto sería de gran interés ya que existen muy pocos biomarcadores predictivos de respuesta, y aquellos con los que contamos siguen siendo imperfectos (como

PD-L1 o la carga mutacional total (TMB)), pues sigue existiendo un grupo de pacientes cuyos tumores expresan PD-L1 y que no se benefician de tratamientos con inmunoterapia; por el contrario, algunos pacientes con PD-L1 negativo que responden a dichos tratamientos.

Con nuestros datos observamos que el sistema inmunológico de los pacientes con CPNM es altamente heterogéneo y no puede predecirse solamente con una (o unas pocas) variables clínicas, salvo en el caso del componente inflamatorio subyacente que se relaciona claramente con una situación funcional y nutricional deteriorada. Por eso, consideramos que la caracterización del sistema inmunológico debería incluirse como un factor más en los ensayos clínicos para determinar su papel en la evolución del CPNM. De forma específica, no sólo las subpoblaciones celulares podrían analizarse de forma individual, sino también los *clusters* obtenidos en el presente trabajo, podrían estudiarse como factor predictivo de respuesta a inmunoterapia o de toxicidad producida por estos tratamientos.

CONCLUSIONES

Poden els que creen que poden

Virgilio

6. Conclusiones

1) La edad en sí misma no puede considerarse el factor principal para el desarrollo de la inmunosenescencia en los pacientes con CPNM. Los cambios del sistema inmune con la edad, se producen en momentos distintos en las diferentes poblaciones linfocitarias y no puede hallarse un único punto de corte de edad para todas las poblaciones que distinga dos grupos de individuos con niveles celulares claramente distintos. No obstante, puede concluirse que, en el caso de los linfocitos T CD8⁺ el punto de corte es más alto para la mayoría de subpoblaciones (alrededor de 75-80 años, salvo en los linfocitos inmaduros), frente a los puntos de corte de los linfocitos T CD4⁺, por lo que estos cambios deben producirse de forma más precoz en los linfocitos CD4⁺.

2) El sexo de los pacientes con CPNM se relaciona con los niveles de linfocitos inmaduros, de modo que las mujeres, presentan niveles más elevados de este subtipo celular. La situación funcional medida con la escala ECOG se asocia a parámetros inflamatorios e inmunológicos: los pacientes con ECOG deteriorado presentan elevación de elementos proinflamatorios (PCR, IL-6, neutrófilos) y linfopenia; por otro lado, los pacientes con mejor situación funcional, poseen niveles mayores de linfocitos CD8⁺ totales así como CD4⁺ centrales de memoria y efectores de memoria. En cambio, el estadio

no puede relacionarse con los principales marcadores de inmunosenescencia.

3) Las células dendríticas se relacionan con el estadio tumoral, siendo más abundantes en los pacientes con estadio II. Algunas subpoblaciones de linfocitos T $\gamma\delta$ se asocian con variables clínicas: los linfocitos $V\delta 1^+V\delta 2^+$ son más bajos en los pacientes con ECOG deteriorado, y en individuos jóvenes con MNA alterado.

4) El estado nutricional se relaciona fundamentalmente con parámetros inflamatorios, de modo que los pacientes con peor situación nutricional muestran niveles elevados de IL-6, PCR y neutrófilos y niveles bajos de albúmina. En cuanto a los parámetros inmunológicos, este hecho se asocia también a linfopenia; en concreto, los pacientes con caquexia tienen niveles más bajos de linfocitos $CD8^+$ totales y $CD4^+$ maduros, aunque no puede definirse un patrón inmunitario predominante en función de la situación nutricional, el IMC y la evaluación con MNA.

5) En los pacientes ancianos, algunas de las dimensiones de la valoración geriátrica integral se relacionan con poblaciones linfocitarias determinadas: los niveles linfocitos T reguladores son más bajos en pacientes con dependencia para actividades instrumentales (medido con el test de Lawton-Brody), con limitación moderada-severa para la movilización (evaluado con SPPB) y con deterioro cognitivo (estudiado con el test de

Pfeiffer). También los pacientes con deterioro cognitivo exhiben niveles más bajos de linfocitos CD8⁺ centrales de memoria.

6) En los pacientes jóvenes, la situación emocional, medida con el test de ansiedad-depresión no se correlaciona con su situación inmunológica ni con el estatus inflamatorio.

7) La infección por CMV es el factor más consistente en el desarrollo de los cambios de la inmunosenescencia. La exposición a CMV se relaciona con niveles más altos de todas las subpoblaciones linfocitarias maduras, exhaustas y con diferenciación terminal en los pacientes con CPNM.

8) En los pacientes diagnosticados de CPNM pueden identificarse grupos definidos por patrones inmunológicos mediante técnicas de *clustering*. El *cluster* más llamativo se caracteriza por la presencia de neutrofilia, trombofilia y linfopenia; y está integrado por individuos jóvenes, con ECOG deteriorado, hipoalbuminemia y elevación de IL-6 y PCR.

CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS

7. Contribuciones científicas derivadas de la tesis doctoral

7.1. Comunicaciones científicas en congresos nacionales e internacionales

7.1.1. Comunicaciones en congresos internacionales

Soria-Comes, Teresa; Palomar-Abril, V; Martín Ureste, M et al. *Cognitive impairment is related to a lower count of B-lymphocytes in elderly patients diagnosed with non-small cell lung cancer*. En SIOG 2018 – Poster presentations. En *Journal of Geriatric Oncology*. Vol. 9. Issue 6, S1, 2018, page S36. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1879-4068\(18\)30440-5](https://doi.org/10.1016/S1879-4068(18)30440-5)

Soria-Comes, Teresa; Palomar-Abril, V; Martín Ureste, M et al. *Signs of immunosenescence in patients diagnosed with. Non-small cell lung cancer*. En *ESMO Immuno-oncology congress*. 2018. En: *Annals of Oncology*. Vol. 29. Supplement 6. Issue: Dec 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy493.017>

Soria-Comes, Teresa; Palomar-Abril, V; García Sánchez, J et al. *Impact of clinical parameters on CD8 and CD4 lymphocyte distribution in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC)*. En *ESMO Annual Meeting*. 2020. En: *Annals of Oncology*. Vol. 31. Supplement 4. S286, Issue: September 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.08.233>

Soria-Comes, Teresa; Palomar-Abril, V; Martín Ureste, M et al. *Geriatric classification predicts immunological status in old patients diagnosed with non-small cell lung cancer (NSCLC)*. En SIOG 2021 – Poster presentations. En *Journal of Geriatric Oncology*. Vol. 12. Issue 8, S6, 2021, page S36. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1879-4068\(21\)00339-8](https://doi.org/10.1016/S1879-4068(21)00339-8).

A continuación se adjuntan los pósteres correspondientes:

Cognitive impairment is related to a reduced count of B-lymphocytes in elderly patients diagnosed with non-small cell lung cancer

Teresa Soria-Comes¹, Vicente Palomar-Abril², María Martín Ureste¹, Javier García Sánchez¹, María del Carmen Cancela Gómez¹, Inmaculada C. Maestu Maiques¹

¹Hospital Universitario Doctor Peset, Valencia (Spain), ²Hospital Virgen de los Lirios, Alcoy (Spain)

INTRODUCTION

During the last few years there has been a great development of immunotherapy, especially in **non-small cell lung cancer (NSCLC)**, due to its relationship between inflammation and tumour progression¹. There is also a deeper knowledge about the changes in immune system that occur with aging (named **immunosenescence**)². Furthermore, it would be interesting to know if there is a connection between these immunological variations and other clinical parameters such as cognitive impairment.

OBJECTIVE

Our objective is to assess, in elderly population diagnosed with NSCLC, if there is a statistically significant **difference in lymphocyte populations³ depending on their cognitive status** defined by the screening Pfeiffer test.

METHODS

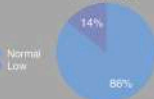
We retrospectively reviewed the clinical history of **patients of ≥ 70 years diagnosed with NSCLC** from January 2017 to April 2018. Patients with immunodeficiency or with autoimmune diseases were excluded. Among the cases reviewed, only patients with the **Pfeiffer test performed were included**. Lymphocyte count by flow cytometry was gathered from the blood test at baseline and we studied if there were **statistically significant differences in lymphocyte counts between de patients with a Pfeiffer result of 0-3 mistakes (not impaired) vs 4-10 mistakes (impaired)**⁴. The non-parametric Mann-Whitney test was used.

RESULTS

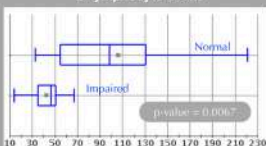
Demographic characteristics

	N° of patients (n=35)	%
Age		
Median	79	
Range	70 - 90	
Sex		
Female	5	14.3
Male	30	85.7
ECOG		
0	13	37.1
1	14	40
2	6	17.1
3	2	5.8
4	0	0
Histology		
Adenocarcinoma	18	51.3
Squamous carcin.	15	42.9
Other	2	5.8

Pfeiffer test



B-lymphocyte count



Mean value of B-lymphocyte in patients with impaired cognitive function = 47 cells/mm³
Mean value of B-lymphocyte count in patients with normal cognitive function = 96.5 cells/mm³

Innate immunity: the mean value of NK lymphocyte was similar between the two groups (impaired vs. not impaired) (285 vs. 296 cells/mm³, p = 0.6309).

In the subpopulation of **T-lymphocytes** no differences were found: the mean value of total T-lymphocyte count was 921 (impaired) vs. 1207 (not impaired) (p = 0.3367); for CD4+ T-lymphocytes, 546 vs. 610 (p = 0.3142) and for CD8+ T-lymphocytes, 450 vs. 466 (p = 0.5071).

CONCLUSIONS

The results from our analysis show that **B-lymphocyte count is lower in patients with cognitive impairment**. These findings suggest that **clinical features are related to immunological status in elderly patients diagnosed with NSCLC**. However this needs further investigation, and this is why we are performing deeper studies on clinical parameters of geriatric assessment including larger cohorts and prospective analysis.

Keywords

Immunosenescence, Non-small cell lung cancer (NSCLC), Cognitive assessment, Pfeiffer test, Lymphocyte

REFERENCES

1. Hironaka T, et al. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35:1533-42.
2. Sallan D, et al. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31:3533-40.
3. Pfeiffer E. *A practical method for grading the clinician*. *Journal of the American Geriatrics Society*. 1975;23:372-84.
4. Soria-Comes T, et al. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36:1935-42.

BACKGROUND

- Lately, there has been a great evolution of immunotherapy in non-small cell lung cancer (NSCLC) due to its relationship with inflammation.
- There is also a growing interest in the changes produced in immune system with age (a process known as immunosenescence).
- However, it is unclear if these differences also exist among elderly patients with cancer compared to adult patients with the same diagnose.

OBJECTIVES

- Primary objective**
- To analyze if there are significant differences in the main parameters of immunosenescence (NK lymphocytes, B cells and CD4:CD8 ratio) between elderly and young adults diagnosed with NSCLC.
- Secondary objectives**
- To evaluate if total count of T lymphocytes is different in young and elderly patients.
 - To assess if there is a relationship between CD4+ and CD8+ T lymphocyte counts and aging.

KEYWORDS: lymphocyte, Flow cytometry, Non-small cell lung cancer, Immunosenescence

METHODS

- Study design**
- We performed an observational retrospective study including patients diagnosed of NSCLC during January to December 2017 at Hospital Universitario Doctor Peset (Valencia, Spain) at the time of diagnosis.
 - Patients were excluded if they had been diagnosed with chronic infections or autoimmune diseases.
 - Included cases were divided into two groups depending on age (elderly patient > 70 years).
- Blood samples and lymphocyte count**
- During the first appointment in Medical Oncology, blood samples were taken and collected aseptically by centrifugure and collected in EDTA tubes.
 - Lymphocyte count by flow cytometry was gathered at baseline.
- Statistical analysis**
- Frequency tabulation and summary statistics are listed to characterize the data distributions.
 - Kolmogorov-Smirnov was used for the distribution test.
 - The non-parametric Mann-Whitney U test was used to assess differences in young and subpopulation counts between young and elderly patients (significant p-value if < 0.05).

RESULTS

Patients

In our study 81 patients were analyzed; 32 in the elderly group and 49 in the young group. Patients ranged from 48 to 90 years. Table 1 summarizes the clinical and demographic characteristics in both groups.

Comparative results of median lymphocyte count in both groups are shown in table 2.

Table 1. Demographic characteristics.

Age (years)	N° of patients (n=81)	
	Young (n=49)	Elderly (n=32)
Sex -no. (%)		
Male	7 (27.8)	7 (14.3)
Female	25 (78.1)	42 (85.7)
Stage		
I	0 (0)	0 (0)
II	0 (0)	0 (0)
III	0 (0)	0 (0)
IV	0 (0)	0 (0)
Stage (no.)	0 / 1 / 2 / 3 / 4	0 / 1 / 2 / 3 / 4
Adenocarcinoma	25 (78.1)	29 (89.2)
Squamous cell carcinoma	3 (9.4)	3 (9.4)
Other	0 (0)	0 (0)
Stage (no.)	0 / 1 / 2 / 3 / 4	0 / 1 / 2 / 3 / 4

Table 2. Median lymphocyte counts in patients diagnosed with NSCLC according to age.

Cell count - cells/mm ³	Elderly (n = 32)		Young (n = 49)		p
	Mean	SD	Mean	SD	
NK lymphocytes	195	255	0,0014	0,1420	
T lymphocytes	695	1047	0,1420	0,0005	
CD4+ T lymphocytes	503	588	0,0005	0,0002	
CD8+ T lymphocytes	128	90	0,0002	0,0009	
CD4:CD8 ratio	1,80	1,32			

Innate immunity

Regarding the innate immunity, the median value of NK lymphocytes showed to be higher in the cohort of patients >70 years (table 2, figure 1).

Figure 1. Median values of NK lymphocytes.



Adaptive immunity

- There was no difference between the median values of T lymphocytes (p = 0.142) (table 2).
- Interestingly, analyzing T lymphocyte subsets we saw that the median values were higher in the elderly group (figure 2).
- However, there was no difference in the CD4+ T lymphocyte subset (p = 0.4929).
- Median CD4:CD8 ratio was lower in elderly patients, with a higher mean percentage of patients with an inverted ratio were not statistically significant (figure 3).

Figure 2. Median values of CD8+, T lymphocytes.



Figure 3. Percentage of inverted CD4:CD8 ratio.

CONCLUSIONS

• Our results are similar to the ones reported in non-oncologic population, such as an increased number of NK lymphocytes in elderly patients and a lower count of B lymphocytes.

CONCLUSIONS

- Therefore, signs of immunosenescence can be seen in elderly patients with NSCLC.
- However, subpopulations of lymphocytes show more accurately cell functionality. This is why we are performing deeper research regarding the changes in immune system in oncologic patients including larger cohorts and prospective analysis.

References

1. Park S, Hwang M, Park H, et al. The Immune System in Lung Cancer: A Review of the Literature. J Thorac Oncol. 2018;13(12):1417-1427.
2. Tsimpanogiannis I, et al. Immunosenescence and its impact on cancer. Immunol Rev. 2015;268(1):181-193.
3. Liu H, et al. Immunosenescence and its impact on cancer. Immunol Rev. 2015;268(1):181-193.
4. Wang J, et al. Immunosenescence and its impact on cancer. Immunol Rev. 2015;268(1):181-193.

Corresponding author: L.soria.comes@gmail.com

BACKGROUND

- Lately, there has been a great evolution of immunotherapy in non-small cell lung cancer (NSCLC) due to its relationship with inflammation.
- There is also a growing interest in the changes produced in immune system with immunosuppression (as immunosenescence).
- However, it is unclear if these differences also exist among patients with cancer and if other clinical parameters can influence immunosenescence.

OBJECTIVES

- Primary objective
 To analyze if age and other clinical features can influence the distribution of CD8+ and CD4+ lymphocyte (L) subpopulations in patients diagnosed with NSCLC.
- Secondary objectives
 To evaluate if functional status (measured with the ECOG status) can influence L distribution. To study if weight loss, immunosuppression, CD4+ and CD8+ T-L distribution and tumor stage.
 To study if weight loss can influence L values.

KEYWORDS: Lymphocyte, Flow cytometry, Non-small cell lung cancer, Immunosenescence

METHODS

Study design

We performed a prospective observational study of patients diagnosed with NSCLC during April 2018 to February 2020 at Hospital Universitario Doctor Peset (Valencia, Spain) at the time of diagnosis.
 • Patients were excluded if they had been diagnosed with chronic infections or autoimmune diseases.
 • Included cases were divided into two groups depending on their (cut-off point: 70 years). Patients older than 70 years were considered high (≥ 70). Significant weight loss (1-5%).

Blood samples and lymphocyte count

• During the first appointment in Medical Oncology, blood samples were obtained aseptically by venipuncture and collected in EDTA tubes. Lymphocyte count was performed at baseline by flow cytometry.
 • Lymphocyte subpopulations were classified using flow cytometry: CD3+ CD8+ (CD8+), CD3+ CD4+ (CD4+), CD3+ CD4+ CD8+ (CD8+), CD4+ and CD8+ T cells (CD4+ and CD8+), CD4+ and CD8+ T cells (CD4+ and CD8+), central memory (CM), effector memory (EM), and terminally differentiated (TEMRA).

Statistical analysis

• Frequency tabulation and summary statistics are listed to characterize data distributions.
 • Multivariate regression models were used to assess the impact of clinical parameters (age, ECOG status, immunosuppression, weight loss and CD4+L subpopulations (%), p-value<0.05

RESULTS

Patients

In our study 98 patients were analysed.
 Table 1. Clinical and demographic characteristics.

Characteristic	N	%
Age (years)	67.5 (62-85)	
Median (range)	67 (52-85)	
Male (%)	86 (87.2)	
Female (%)	12 (12.8)	
ECOG (no.)	39 / 44 / 26 / 11 / 8	
0 / 1 / 2 / 3 / 4		
Smoking habit, no. (%)	53 / 37 / 10	
No / Yes / Unknown		
Current smoker	3 / 7 / 28 / 49	
1 / 1 / 1 / 1		
Adenocarcinoma	86 (87.2)	
Squamous cell carcinoma	58 (58.0)	
Other	26 (26.2)	
Stage (no.)	3 / 7 / 28 / 49	
1 / 1 / 1 / 1		



Figure 1. Median lymphocyte counts in patients diagnosed with NSCLC according to age.

On multivariate analysis, advanced age was related to higher CD4+L and lower CD8+L and TEMRA-CD8 cells (Table 2, Fig. 2)

CD8+lymphocytes

Furthermore, patients with advanced stage (TEMRA-CD8 cells (Table 2, Fig. 2).

Table 2. Significant variables related to CD8+L subpopulations on each multivariate analysis.

Subpopulation	Parameter	Level expression	p-value
CD8+L (%)	Age	-0.4 (-0.7 - -0.1)	0.002
	ECOG group	-0.3 (-0.5 - -0.1)	<0.001
	Weight loss	-0.3 (-0.5 - -0.1)	0.002
CD8+L (cells)	Age	-3.3 (-3.8 - -2.8)	0.001
	ECOG group	-3.3 (-3.8 - -2.8)	0.001
	Weight loss	-3.3 (-3.8 - -2.8)	0.001
CD8+L (no.)	Age	0.15 (-0.1 - 0.3)	0.013
	ECOG group	0.15 (-0.1 - 0.3)	0.013
	Weight loss	0.15 (-0.1 - 0.3)	0.013
CD8+ TEMRA (no.)	Age	0.27 (0.2 - 0.6)	0.004
	ECOG group	0.27 (0.2 - 0.6)	0.004
	Weight loss	0.27 (0.2 - 0.6)	0.004
CD8+ TEMRA (no.)	Age	3.1 (2.2 - 4.1)	0.008
	ECOG group	3.1 (2.2 - 4.1)	0.008
	Weight loss	3.1 (2.2 - 4.1)	0.008

Figure 2. CD8+L and TEMRA+ lymphocytes according to age.

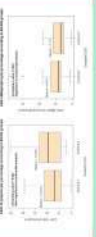
CD4+lymphocytes

Interestingly, advanced CD4+L subpopulations, advanced age was related to higher CD4+L, but higher ECOG-0-2 was related to higher % of N-CD4 and CD4+CD8-cells (Table 3, Fig. 3).

Subpopulation	Parameter	Level expression	p-value
CD4+L (%)	Age	0.33 (0.4 - 0.7)	0.019
	ECOG group	0.33 (0.4 - 0.7)	0.019
	Weight loss	0.33 (0.4 - 0.7)	0.019
CD4+L (no.)	Age	37.0 (41 - 71)	0.008
	ECOG group	37.0 (41 - 71)	0.008
	Weight loss	37.0 (41 - 71)	0.008
CD4+ CD8+ (no.)	Age	-0.7 (-0.8 - -0.6)	0.007
	ECOG group	-0.7 (-0.8 - -0.6)	0.007
	Weight loss	-0.7 (-0.8 - -0.6)	0.007
CD4+ CD8+ (%)	Age	-1.0 (-1.4 - -0.7)	0.020
	ECOG group	-1.0 (-1.4 - -0.7)	0.020
	Weight loss	-1.0 (-1.4 - -0.7)	0.020

Table 3. Significant variables related to CD4+L subpopulations.

Figure 3. CD4+L and effector memory L according to ECOG.



CONCLUSIONS

- In patients with NSCLC aging correlates with the distribution of CD8+ lymphocytes.
- However, ECOG-performance status has a deeper impact in the balance of CD4+ cells and tumoral stage also influences CD8-L distribution.
- Therefore, clinical parameters besides age can influence evolution of immunosenescence in patients with NSCLC.
- Their impact is being studied as a prognostic/ predictive factor in larger cohorts.

References

1. Ferraz O, Sánchez A, Rodríguez A, et al. The effect of immunosuppression on the distribution of CD8+ and CD4+ lymphocytes in patients with non-small cell lung cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2018; 143: 100-108.
2. Soria-Comes T, Palomar-Abri V, Martín-Ureste M, et al. Impact of clinical parameters on CD8 and CD4 lymphocyte distribution in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Cellular Biochemistry*. 2021; 154: 100-108.
3. Soria-Comes T, Palomar-Abri V, Martín-Ureste M, et al. Impact of clinical parameters on CD8 and CD4 lymphocyte distribution in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Cellular Biochemistry*. 2021; 154: 100-108.
4. Soria-Comes T, Palomar-Abri V, Martín-Ureste M, et al. Impact of clinical parameters on CD8 and CD4 lymphocyte distribution in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Cellular Biochemistry*. 2021; 154: 100-108.
5. Soria-Comes T, Palomar-Abri V, Martín-Ureste M, et al. Impact of clinical parameters on CD8 and CD4 lymphocyte distribution in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Cellular Biochemistry*. 2021; 154: 100-108.

Corresponding author: Lsoria.comes@gmail.com

Geriatric classification predicts immunological status in old patients diagnosed with non-small cell lung cancer (NSCLC)

Teresa Soría-Corres¹, Vicente Palomas-Abril², María Martín Urzúa³, María del Carmen Cencelo Gómez², Iñelena Elías Muñoz¹, Inmaculada C. Maestu Malvar²
¹Hospital Universitario de La Ribera, Alzira (Spain), ²Hospital Virgen de los Lirios, Alcoy (Spain), ³Hospital Universitario Doctor Peset, Valencia (Spain)

Introduction

Knowledge about **immunosenescence** is increasing (the changes in immune system with aging), associated to a low grade of inflammation (**inflammaging**). However, this has not been fully studied in older patients with NSCLC.

OBJECTIVE

To assess, in older patients diagnosed with NSCLC, if there is a statistically significant difference in lymphocyte populations depending on **comprehensive geriatric assessment** (CGA), according to Balducci and SIOG1 classifications.

Methods

We conducted a prospective study including patients of **≥ 70 years** diagnosed with **NSCLC** from April-18 to December-20. Patients with immunodeficiency or with autoimmune diseases were excluded.

- **CGA** and lymphocyte count by **flow cytometry** were performed at diagnosis.
- Four antibodies were used to determine **CD8 and CD4-lymphocyte (L) subpopulations** (CD28, CD27, CD57, CD45RA), according to their differentiation: naïve (N), central memory (CM), effector memory (EM), and terminally differentiated (TEMRA).
- Multivariate regression models were used.

Results

We analysed 59 patients: 15.3% were women. **Performance status** was 0-1 in 71.2%. Figure 1 shows distribution according to Balducci and SIOG1 classification.

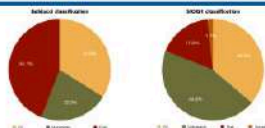


Table 1. Multivariate regression analysis of clinical variables, CRP and lymphocyte subpopulations in patients grouped by Balducci classification (left) and SIOG1 distribution (right).

	Balducci classification			SIOG1 classification		
	Coef.	95% coef interval (CI)	p-value	Coef.	95% CI	p-value
Age at diagnosis	0.153	[-0.262, 0.565]	0.4662	0.167	[-0.239, 0.573]	0.4634
ECOG	0.1317	[-0.117, 0.381]	0.3475	0.1364	[-0.101, 0.373]	0.2618
CRP	0.0041	[-0.0004, 0.0049]	0.0517	0.0044	[-0.0007, 0.0032]	0.0004
CD4+N	-0.2818	[-0.323, -0.2407]	0.1388	-0.2814	[-0.3227, -0.2401]	0.0004
CD4-CM	0.0353	[-0.011, 0.0815]	0.1815	0.3405	[-0.0038, 0.0017]	0.0012
CD4-EM	-0.0011	[-0.0019, 0.0022]	0.4911	0.0008	[-0.0011, 0.0022]	0.4442
CD4-TEMRA	-0.2971	[-0.3334, -0.2607]	0.1223	-0.4054	[-0.4048, -0.406]	0.1343
CD8+N	0.0034	[-0.008, 0.0148]	0.5144	-0.0007	[-0.0011, 0.0001]	0.3631
CD8-CM	-0.0006	[-0.0018, 0.0005]	0.4197	-0.0026	[-0.0019, -0.0034]	0.1993
CD8-EM	-0.0013	[-0.0011, 0.0011]	0.1926	0.0003	[-0.0018, 0.0024]	0.3917
CD8-TEMRA	-0.0038	[-0.007, -0.0007]	0.0004	-0.0014	[-0.0027, -0.0001]	0.0014

- **Older age** at diagnosis correlated with both assortments.
- Higher **ECOG** was only associated with higher vulnerability in the **SIOG1** categorisation ($p = 0.01$).
- Patients with **vulnerability or frailty in both scales**, had higher counts of **CD8-N lymphocytes** (regression coefficient (RC) = 0.01, $p < 0.05$) and lower counts of **CD8-TEMRA L** (RC = -0.004 and -0.002, respectively).
- Higher **CD4-N L** and greater values of **C-reactive protein (CRP)** were only related to vulnerability or frailty according to **SIOG1** grouping (RC = -0.001 and 0.005; $p = 0.01$ and 0.03, respectively).

CONCLUSIONS

The results from our analysis show that **geriatric classifications** according to validated scales could help **predicting immunological status** of older patients diagnosed with NSCLC. Specifically, **SIOG1** grouping shows greater correlation to lymphocyte counts.

Keywords Immunosenescence NSCLC Comprehensive geriatric assessment Lymphocyte population

Funding: FISABIO

Corresponding author: t.soria.comes@gmail.com

7.1.2. Comunicaciones en congresos nacionales

Soria-Comes, Teresa; Palomar-Abril, V; Martín Ureste, M et al. *Valor pronóstico de la evolución de la ratio de neutrófilos/linfocitos en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico tratados con pembrolizumab en 1ª línea*. En el Congreso del Grupo Español de Cáncer de Pulmón, 2019 (P30).

Soria-Comes, Teresa; Martín Ureste, M; García Sánchez, J et al. *Impacto de la función cognitiva sobre parámetros de inmunosenescencia en pacientes ancianos diagnosticados de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM)*. En la Jornada Nacional de Oncogeriatría, 2019.

A continuación se adjuntan los pósteres correspondientes:



Valor pronóstico de la evolución de la ratio de neutrófilos/linfocitos en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico tratados con pembrolizumab en 1^o línea

Teresa Soria-Comes¹, Vicente Palomar-Abril², María Martín Ureste¹, Javier García Sánchez¹, María del Carmen Cancela Gómez¹, Inmaculada C. Maestu Maiques¹

¹Hospital Universitario Doctor Peset, Valencia (Spain), ²Hospital Virgen de los Lirios, Alcoy (Spain)

Introducción

Los principales biomarcadores de respuesta a inmunoterapia en cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) son la expresión tumoral de PD-L1 y la carga mutacional; no obstante, algunos pacientes no responden al tratamiento a pesar de las características del tumor.

Por eso, existe un creciente interés por el estado inmunitario e inflamatorio del individuo, que puede jugar un papel determinante también en la respuesta a estos tratamientos.

OBJETIVO

Determinar el impacto de la **variación de la ratio neutrófilos/linfocitos (NLR)** durante los primeros ciclos de tratamiento con **Pembrolizumab en 1^o línea** en la evolución de la enfermedad.

Material y métodos

Estudio retrospectivo incluyendo a pacientes diagnosticados de CPNM con enfermedad avanzada y PD-L1 $\geq 50\%$ que recibieron Pembrolizumab en 1^o línea entre Diciembre 2018 y Octubre 2019 en nuestro centro.

Se registraron los valores de neutrófilos y linfocitos al diagnóstico, tras 2 ciclos de tratamiento, y en el momento de la progresión de enfermedad. Valor de **NLR** obtenido con la fórmula = **neutrófilos/linfocitos**.

Análisis estadístico: para la estimación de la supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG) el método Kaplan-Meier y para el estudio multivariante se ha empleado la regresión de Cox.

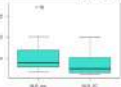
Resultados

Las características demográficas de la muestra se resumen en la Tabla 1. La **media de NLR** al diagnóstico fue 4,5, y tras 2 ciclos, 2,84 (Figura 1). En el momento del análisis 8 pacientes habían experimentado progresión de enfermedad, con media de NLR = 5,5.

Tabla 1. Características demográficas

	Nº pacientes (n=20)
Edad - nº (%)	
Mediana	67
Rango	46 - 79
Sexo - nº (%)	
Mujeres	8 (40%)
Varones	12 (60%)
ECOG - nº (%)	
0	2 (10%)
1	12 (60%)
2	6 (30%)
Histología	
Adenocarcinoma	12 (60%)
Carcinoma escamoso	5 (25%)
Otras	3 (15%)

Figura 1. Diagrama de barras: distribución de NLR al diagnóstico (pre) y tras 2 ciclos (2C)



Análisis de supervivencia: la mediana de SLP a nivel global fue 10,1 meses y la SG, 21,2 meses.

En el **análisis multivariante** (Tabla 2) el valor de NLR tras 2 ciclos de tratamiento se relacionó directamente con la SLP y SG. Tomando como punto de corte NLR = 5, los pacientes con NLR elevado, presentaron una SLP 4,5 vs. 10,71 respecto al grupo con NLR <5 (p=.01; Figura 2); y una SG 18,5 meses vs. no alcanzada, respectivamente (p=.05).

Tabla 2. Análisis multivariante

	SLP		SG	
	HR (IC 95%)	p valor	HR (IC 95%)	p valor
ECOG	0,89 (0,66 - 1,23)	0,38	1,31 (0,07 - 23,0)	0,85
Edad al diagnóstico	0,85 (0,71 - 1,06)	0,14	1,24 (0,91 - 1,71)	0,18
NLR basal	0,72 (0,49 - 1,07)	0,08	0,85 (0,58 - 1,25)	0,41
NLR tras 2 ciclos	7,46 (1,45 - 39,54)	0,01	1,66 (0,96 - 2,78)	0,05

Figura 2. Curvas de Kaplan-Meier para SLP en función de NLR (corte =5)



CONCLUSIONES

El valor de **NLR tras 2 ciclos** ha demostrado relación con la **supervivencia de los pacientes tratados en primera línea con pembrolizumab**. El **status inflamatorio** del individuo es un elemento cambiante a lo largo de la enfermedad y en el curso de la terapia por lo que debe considerarse su reevaluación en este proceso para detectar fallos precoces del tratamiento y planificar actuaciones posteriores

Palabras clave Cá. pulmón no microcítico Ratio neutrófilos/linfocitos Pembrolizumab Inflammaging

Contacto: t.soria.comes@gmail.com

Impacto de la función cognitiva sobre parámetros de inmunosenescencia en pacientes ancianos diagnosticados de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM)

Teresa Soría-Comes, María Marín Ureste, Javier García Sánchez, María del Carmen Cancela Gómez, Helena Eifau Mur, Sergio Pascual Solaz, Inmaculada Maestu Malques.

Oncología Médica, Hospital Universitario Doctor Peset, Valencia, España

INTRODUCCIÓN

- La **valoración geriátrica integral (VGI)** tiene un papel crucial en Oncología por la heterogeneidad de la población anciana.
- También existe mayor conocimiento de los cambios del sistema inmune con la edad, conocido como **inmunosenescencia**.
- En neoplasias en las que se emplea inmunoterapia, resulta interesante conocer las características inmunológicas de los pacientes y su interacción con variables clínicas como el deterioro cognitivo.



Objetivo

Establecer si existe relación entre la presencia de deterioro cognitivo y parámetros de inmunosenescencia.

RESULTADOS

Tabla 1. Características basales de los pacientes.

	N = 54
Sexo (♀/♂) -n°	11/43
Edad -Me (rango)	76 (70-90)
ECOG -n° (%)	0-1: 38 (70.4%) 2: 16 (29.6%)
Clasificación según el test Pfeiffer -n° (%)	0-2 fallos: 7 (13%) 3-10 fallos: 47 (87%)

Inmunidad innata

- La mediana de linfocitos NK fue similar en los pacientes con función cognitiva normal vs. alterada (p=0.16).

Inmunidad adaptativa

- No se encontraron diferencias entre los valores de linfocitos T en función del estado cognitivo (p=0.25).
- En el estudio de subpoblaciones de linfocitos T-CD4+ y CD8+ tampoco se objetivaron diferencias (p=0.29 y 0.45, respectivamente).
- La **mediana de linfocitos B** demostró ser significativamente **menor en los pacientes con deterioro cognitivo** (47 vs 74 cél/mm³, p=0.01).

CONCLUSIONES

- En nuestro estudio el recuento de linfocitos B es menor en los pacientes con deterioro cognitivo.
- Estos hallazgos sugieren que existen **parámetros clínicos que pueden estar relacionados con el estado inmunitario de los pacientes ancianos** diagnosticados de CPNM.
- Estamos investigando en profundidad los parámetros de inmunosenescencia y factores clínicos incluidos en la VGI en cohortes más amplias incluyendo análisis prospectivos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

- Estudio observacional retrospectivo.
- Inclusión de pacientes **≥ 70 años diagnosticados de CPNM** en nuestro centro entre Abril 2017 y Enero 2019 en los que se hubiera realizado valoración cognitiva al diagnóstico (**test Pfeiffer**) como parte de la VGI.
- Exclusión de pacientes con enfermedades autoinmunes o inmunodeprimidos.

Análisis estadístico

- Estudio de diferencias entre las poblaciones linfocitarias (en analítica basal mediante citometría de flujo) de los pacientes con un resultado en test de Pfeiffer 0-2 (normal) o 3-10 (alterado).
- Uso del test no-paramétrico de Mann-Whitney y el modelo multivariante de regresión múltiple.

Figura 1. Mediana de linf.B en función de la situación cognitiva (normal vs. alterada) estudiada mediante el test de Pfeiffer.



En el **análisis multivariante**, se incluyeron distintos parámetros clínicos: cognitivo (Pfeiffer), nutricional (IMC) y funcional (ECOG) y la alteración cognitiva seguía relacionándose con un menor nivel de linfocitos B de forma independiente (Tabla 2).

Tabla 2. Impacto de parámetros clínicos sobre linf. B.

	Odds ratio (IC 95%)	p valor
Test Pfeiffer (normal vs. alterado)	9,04 x 10 ⁻²⁴ (2,44x10 ⁻⁴⁶ - 0,34)	0.045
IMC (kg/m2)	0,05 (0,0007 - 3,62)	0,167
ECOG	0,0006 (1,05x10 ⁻¹² - 3,95x10 ⁹)	0,469

Bibliografía

- Larbi A, Fulop T. From "truly naive" to "exhausted senescent"! T cells: When markers predict functionality. *Cytom Part A* 2014;85:25-35. doi:10.1002/cyto.a.22351.
- Molina-Gamado MJ, Guillén-Ponce C, Blanco R, Jordano J, Feliz J, Antonio M, et al. Delphi consensus of an expert committee in oncogeriatrics regarding comprehensive geriatric assessment in seniors with cancer in Spain. *J Geriatr Oncol* 2018;9:337-45. doi:10.1016/j.jgo.2017.11.012.
- Frasca D, Björnsdóttir B. Effects of aging on B cell function. *Curr Opin Immunol* 2009;21:425-30. doi:10.1146/annurev-immun.01.060407.125627.Brain.
- Noro-García MA, Alonso-Anas R, López-Vázquez A, Suárez-García FM, Solano-Juarez JJ, Balleja J, et al. Relationship between functional ability in older people, immune system status, and intensity of response to CMV. *Age (Oxford)* 2012;34:479-95. doi:10.1007/s11357-011-9240-6.

Correspondencia: t.soria.comes@gmail.com

7.2. Publicaciones en revistas científicas

Soria-Comes, Teresa; Palomar-Abril, V; Martín Ureste, M; et al. *Cognitive impairment is related to a reduced count of T-lymphocytes in older patients diagnosed with non-small cell lung cancer (NSCLC)*. En *Translational Cancer Research*. 2020 Nov;9(11):6857-6866. doi: 10.21037/tcr-20-1997.

REFERENCIAS

8. Referencias

1. Brodin P, Davis MM (2017) Human immune system variation. *Nat Rev Immunol* 17:21–29.
<https://doi.org/10.1038/nri.2016.125>
2. Chaplin DD (2010) Overview of the immune response. *Allergy Clin Immunol* 125:S2-23.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980.Overview>
3. Medzhitov R, Janeway CA (1997) Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91:295–298. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80412-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80412-2)
4. Medzhitov R (2013) Pattern Recognition Theory and the Launch of Modern Innate Immunity. *J Immunol* 191:4473–4474.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302427>
5. Nguyen A V., Soulika AM (2019) The dynamics of the skin's immune system. *Int J Mol Sci* 20:1–53.
<https://doi.org/10.3390/ijms20081811>
6. Iwasaki A, Foxman EF, Molony RD (2017) Early local immune defenses in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol* 17:7–20. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.117>.
7. Underhill DM, Iliev ID (2014) The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nat Rev Immunol* 14:405–416.
<https://doi.org/10.1038/nri3684.The>

8. Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140:805–820.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
9. Bianchi ME (2007) DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81:1–5.
<https://doi.org/10.1189/jlb.0306164>
10. Reid KBM (2018) Complement component C1q: Historical perspective of a functionally versatile, and structurally unusual, serum protein. *Front Immunol* 9:1–6.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00764>
11. Noris M, Remuzzi G (2013) Overview of complement activation and regulation. *Semin Nephrol* 33:479–492.
<https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2013.08.001>
12. Haney EF, Mansour SC, Hancock REW (2017) Antimicrobial peptides: An introduction. *Methods Mol Biol* 1548:3–22. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6737-7_1
13. Pathak A, Agrawal A (2019) Evolution of C-reactive protein. *Front Immunol* 10:.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00943>
14. Rajab IM, Hart PC, Potempa LA (2020) How C-Reactive Protein Structural Isoforms With Distinctive Bioactivities Affect Disease Progression. *Front Immunol* 11:1–12.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02126>
15. Wu Y, Potempa LA, El Kebir D, Filep JG (2015) C-reactive protein and inflammation: Conformational changes affect function. *Biol Chem* 396:1181–1197.

<https://doi.org/10.1515/hsz-2015-0149>

16. Sproston NR, Ashworth JJ (2018) Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol* 9:754.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00754>
17. Vijay K (2018) Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *Int Immunopharmacol* 59:391–412.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.03.002>
18. Mukherjee S, Huda S, Sinha Babu SP (2019) Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review. *Scand J Immunol* 90:1–18.
<https://doi.org/10.1111/sji.12771>
19. Urban-Wojciuk Z, Khan MM, Oyler BL, et al (2019) The role of TLRs in anti-cancer immunity and tumor rejection. *Front Immunol* 10:1–10.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02388>
20. Thomas CA, Li Y, Kodama T, et al (2000) Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis. *J Exp Med* 191:147–155. <https://doi.org/10.1084/jem.191.1.147>
21. Schroder K, Tschopp J (2010) The Inflammasomes. *Cell* 140:821–832. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040>
22. Xia X, Wang X, Cheng Z, et al (2019) The role of pyroptosis in cancer: pro-cancer or pro-“host”? *Cell Death Dis* 10:. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1883->

23. Zheng Z, Li G (2020) Mechanisms and Therapeutic Regulation of Pyroptosis in Inflammatory Diseases and Cancer. *Int J Mol Sci* 21:..
<https://doi.org/10.3390/ijms21041456>
24. Wilkins C, Gale M (2010) Recognition of viruses by cytoplasmic sensors. *Curr Opin Immunol* 22:41–47.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.12.003>
25. Huber-Lang M, Lambris JD, Ward PA (2018) Innate immune responses to trauma
26. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, et al (2002) Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20:621–667.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828>
27. Kolaczkowska E, Kubes P (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13:159–175. <https://doi.org/10.1038/nri3399>
28. Massena S, Christoffersson G, Hjertström E, et al (2010) A chemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils. *Blood* 116:1924–1931.
<https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-266072>
29. Gonzalez-Aparicio M, Alfaro C (2019) Influence of interleukin-8 and neutrophil extracellular trap (NET) formation in the tumor microenvironment: Is there a

- pathogenic role? *J. Immunol. Res.* 2019
30. Mócsai A (2013) Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.* 210:1289–1299
 31. Silvestre-Roig C, Fridlender ZG, Glogauer M, Scapini P (2019) Neutrophil Diversity in Health and Disease. *Trends Immunol* 40:565–583.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2019.04.012>
 32. Sollberger G, Tilley DO, Zychlinsky A (2018) Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization. *Dev. Cell* 44:542–553
 33. Yipp BG, Petri B, Salina D, et al (2012) Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med* 18:1386–1393.
<https://doi.org/10.1038/nm.2847>
 34. Papayannopoulos V (2018) Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* 18:134–147.
<https://doi.org/10.1038/nri.2017.105>
 35. Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, et al (2016) Dendritic cells, monocytes and macrophages: A unified nomenclature based on ontogeny. *Front Immunol* 7:.
<https://doi.org/10.1038/nri3712>
 36. Sprangers S, Vries TJD, Everts V (2016) Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells. *J Immunol Res* 2016:.
<https://doi.org/10.1155/2016/1475435>

37. Guilliams M, Mildner A, Yona S (2018) Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* 49:595–613.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.005>
38. Gentek R, Molawi K, Sieweke MH (2014) Tissue macrophage identity and self-renewal. *Immunol Rev* 262:56–73. <https://doi.org/10.1111/imr.12224>
39. Varol C, Mildner A, Jung S (2015) Macrophages: Development and tissue specialization
40. Kurotaki D, Sasaki H, Tamura T (2017) Transcriptional control of monocyte and macrophage development. *Int Immunol* 29:97–107
41. Gordon S, Plüddemann A (2019) The mononuclear phagocytic system. Generation of diversity. *Front Immunol* 10:1–10.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01893>
42. Shi C, Pamer EG (2011) Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 11:762–774. <https://doi.org/10.1038/nri3070>
43. Lavin Y, Mortha A, Rahman A, Merad M (2015) Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol* 15:731–744.
<https://doi.org/10.1038/nri3920>
44. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR (2013) Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 14:986–995.
<https://doi.org/10.1038/ni.2705>

45. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al (2018) Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease
46. Collin M, Bigley V (2018) Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* 154:3–20.
<https://doi.org/10.1111/imm.12888>
47. Hartgers FC, Figdor CG, Adema GJ (2000) Towards a molecular understanding of dendritic cell immunobiology. *Immunol. Today* 21:542–545
48. Gulubova M (2019) Myeloid and plasmacytoid dendritic cells and cancer – New insights. *Open Access Maced J Med Sci* 7:3324–3340.
<https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.735>
49. Kotsias F, Cebrian I, Alloatti A (2019) Antigen processing and presentation. *Int Rev Cell Mol Biol* 348:69–121.
<https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2019.07.005>
50. Reizis B (2019) Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity* 50:37–50. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.12.027>
51. K. S. Versteeg, I. R. Konings¹ A. M. Lagaay AA van de L& HMWV (2014) Prediction of treatment-related toxicity and outcome with geriatric assessment in elderly patients with solid malignancies treated with chemotherapy: a systematic review. *Ann Oncol* 25:1914–1918.
<https://doi.org/10.4061/2011/523276>
52. Anderson DA, Dutertre CA, Ginhoux F, Murphy KM

- (2020) Genetic models of human and mouse dendritic cell development and function. *Nat Rev Immunol*.
<https://doi.org/10.1038/s41577-020-00413-x>
53. Chistiakov DA, Sobenin IA, Orekhov AN, Bobryshev Y V. (2015) Myeloid dendritic cells: development, functions, and role in atherosclerotic inflammation. *Immunobiology* 220:833–844. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.12.010>
 54. Calzetti F, Tamassia N, Micheletti A, et al (2018) Human dendritic cell subset 4 (DC4) correlates to a subset of CD14^{dim}/–CD16⁺⁺ monocytes. *J Allergy Clin Immunol* 141:2276-2279.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.12.988>
 55. Heesters BA, Myers RC, Carroll MC (2014) Follicular dendritic cells: Dynamic antigen libraries. *Nat. Rev. Immunol.* 14:495–504
 56. Shortman K, Liu YJ (2002) Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2:151–161.
<https://doi.org/10.1038/nri746>
 57. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, et al (2008) Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9:503–510.
<https://doi.org/10.1038/ni1582>
 58. Caligiuri MA (2008) Human natural killer cells. *Blood* 112:461–469. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-077438>
 59. Choucair K, Duff JR, Cassidy CS, et al (2019) Natural killer cells: A review of biology, therapeutic potential and

- challenges in treatment of solid tumors. *Futur Oncol* 15:3053–3069. <https://doi.org/10.2217/fon-2019-0116>
60. Björkström NK, Ljunggren HG, Michaëlsson J (2016) Emerging insights into natural killer cells in human peripheral tissues. *Nat Rev Immunol* 16:310–320. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.34>
 61. Paul S, Lal G (2017) The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. *Front Immunol* 8:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01124>
 62. Kovalenko EI, Streltsova MA, Kanevskiy LM, et al (2017) Identification of Human Memory-Like NK Cells. *Curr Protoc Cytom* 79:9.50.1-9.50.11. <https://doi.org/10.1002/cpcy.13>
 63. Netea MG, Schlitzer A, Placek K, et al (2019) Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host Microbe* 25:13–26. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.12.006>
 64. Montaldo E, Vacca P, Moretta L, Mingari MC (2014) Development of human natural killer cells and other innate lymphoid cells. *Semin Immunol* 26:107–113. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.01.006>
 65. Cortez V, Colonna M (2016) Diversity and function of group 1 innate lymphoid cells. *Immunol Lett* 179:19–24. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.07.005>
 66. Geiger TL, Sun JC (2016) Development and maturation

- of natural killer cells. *Curr Opin Immunol* 39:82–9.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.01.007>.Development
67. Spits H, Bernink JH, Lanier L (2016) NK cells and type 1 innate lymphoid cells: Partners in host defense. *Nat Immunol* 17:758–764. <https://doi.org/10.1038/ni.3482>
 68. Cherrier DE, Serafini N, Di Santo JP (2018) Innate Lymphoid Cell Development: A T Cell Perspective. *Immunity* 48:1091–1103.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.05.010>
 69. Montaldo E, Vacca P, Vitale C, et al (2016) Human innate lymphoid cells. *Immunol Lett* 179:2–8.
<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.01.007>
 70. Page C, Pitchford S (2013) Neutrophil and platelet complexes and their relevance to neutrophil recruitment and activation. *Int Immunopharmacol* 17:1176–1184.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.06.004>
 71. Maouia A, Rebetz J, Kapur R, Semple JW (2020) The Immune Nature of Platelets Revisited. *Transfus Medicien Rev* 34:209–220
 72. Dib PRB, Quirino-Teixeira AC, Merij LB, et al (2020) Innate immune receptors in platelets and platelet-leukocyte interactions. *J Leukoc Biol* 108:1157–1182.
<https://doi.org/10.1002/JLB.4MR0620-701R>
 73. Semple JW, Italiano JE, Freedman J (2011) Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* 11:264–274. <https://doi.org/10.1038/nri2956>

74. Klion AD, Ackerman SJ, Bochner B s (2020) Contributions of eosinophils to human health and disease. *Annu Rev Pathol* 24:179–209. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032756>
75. Wen T, Rothenberg ME (2017) The Regulatory Function of Eosinophils. *Myeloid Cells Heal Dis* 4:257–269. <https://doi.org/10.1128/9781555819194.ch14>
76. Schuijs MJ, Hammad H, Lambrecht BN (2019) Professional and ‘Amateur’ Antigen-Presenting Cells In Type 2 Immunity. *Trends Immunol* 40:22–34. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.11.001>
77. Chirumbolo S, Bjørklund G, Sboarina A, Vella A (2018) The role of basophils as innate immune regulatory cells in allergy and immunotherapy. *Hum Vaccines Immunother* 14:815–831. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1417711>
78. Abraham SN, St. John AL (2010) Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol* 10:440–452. <https://doi.org/10.1038/nri2782>
79. Holtzman MJ, Byers DE, Alexander-Brett J, Wang X (2014) The role of airway epithelial cells and innate immune cells in chronic respiratory disease. *Nat Rev Immunol* 14:686–698. <https://doi.org/10.1038/nri3739>
80. Lu JT, Xu AT, Shen J, Ran ZH (2017) Crosstalk between intestinal epithelial cell and adaptive immune cell in

- intestinal mucosal immunity. *J Gastroenterol Hepatol* 32:975–980. <https://doi.org/10.1111/jgh.13723>
81. Hooper L V. (2015) *Epithelial Cell Contributions to Intestinal Immunity*, 1st ed. Elsevier Inc.
 82. Masoodi M, Kuda O, Rossmeisl M, et al (2015) Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1851:503–518.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.09.023>
 83. Kumari M, Heeren J, Scheja L (2018) Regulation of immunometabolism in adipose tissue. *Semin Immunopathol* 40:189–202.
<https://doi.org/10.1007/s00281-017-0668-3>
 84. Larabee CM, Neely OC, Domingos AI (2020) Obesity: a neuroimmunometabolic perspective. *Nat Rev Endocrinol* 16:30–43. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0283-6>
 85. Procaccini C, La Rocca C, Carbone F, et al (2017) Leptin as immune mediator: Interaction between neuroendocrine and immune system. *Dev Comp Immunol* 66:120–129.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.06.006>
 86. Belkaid Y, Harrison OJ (2017) Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity* 46:562–576.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.04.008>. Homeostatic
 87. Negi S, Das DK, Pahari S, et al (2019) Potential role of

- gut microbiota in induction and regulation of innate immune memory. *Front Immunol* 10:1–12.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02441>
88. Zheng D, Liwinski T, Elinav E (2020) Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res* 30:492–506. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>
89. Rooks MG, Garrett WS (2016) Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol* 16:341–352. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.42>. Gut
90. Lloyd CM, Marsland BJ (2017) Lung Homeostasis: Influence of Age, Microbes, and the Immune System. *Immunity* 46:549–561.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.04.005>
91. Sommariva M, Le Noci V, Bianchi F, et al (2020) The lung microbiota: role in maintaining pulmonary immune homeostasis and its implications in cancer development and therapy. *Cell Mol Life Sci* 77:2739–2749.
<https://doi.org/10.1007/s00018-020-03452-8>
92. Fitzgibbon G, Mills KHG (2020) The microbiota and immune-mediated diseases: Opportunities for therapeutic intervention. *Eur J Immunol* 50:326–337.
<https://doi.org/10.1002/eji.201948322>
93. Netea MG, Quintin J, Van Der Meer JWM (2011) Trained immunity: A memory for innate host defense. *Cell Host Microbe* 9:355–361.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.006>

94. Danilova N (2012) The evolution of adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* 738:218–235. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1680-7_13
95. Sautès-Fridman C, Petitprez F, Calderaro J, Fridman WH (2019) Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 19:307–325. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0144-6>
96. Bonilla FA, Oettgen HC (2010) Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125:. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
97. Radtke F, Fasnacht N, MacDonald HR (2010) Notch Signaling in the Immune System. *Immunity* 32:14–27
98. Van Coppenolle S, Vanhee S, Verstichel G, et al (2012) Notch induces human T-cell receptor $\gamma \delta$ + thymocytes to differentiate along a parallel, highly proliferative and bipotent CD4 CD8 double-positive pathway. *Leukemia* 26:127–138. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.324>
99. Alcover A, Alarcón B, Di Bartolo V (2018) Cell Biology of T Cell Receptor Expression and Regulation. *Annu. Rev. Immunol.* 36:103–125
100. Schatz DG, Ji Y (2011) Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat. Rev. Immunol.* 11:251–263
101. Hayday AC (2019) $\gamma\delta$ T Cell Update: Adaptate Orchestrators of Immune Surveillance. *J Immunol* 203:311–320. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800934>

102. Deseke M, Prinz I (2020) Ligand recognition by the $\gamma\delta$ TCR and discrimination between homeostasis and stress conditions. *Cell Mol Immunol* 17:914–924.
<https://doi.org/10.1038/s41423-020-0503-y>
103. Shiromizu CM, Jancic CC (2018) $\gamma\delta$ T lymphocytes: An effector cell in autoimmunity and infection. *Front Immunol* 9:1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02389>
104. Kisielow J, Kopf M (2013) The origin and fate of $\gamma\delta$ T cell subsets. *Curr Opin Immunol* 25:181–188.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.03.002>
105. Patil RS, Bhat SA, Dar AA, Chiplunkar S V. (2015) The Jekyll and Hyde story of IL17-producing $\gamma\delta$ T cells. *Front Immunol* 6:1–13.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00037>
106. Vantourout P, Hayday A (2013) Six-of-the-best: Unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat Rev Immunol* 13:88–100. <https://doi.org/10.1038/nri3384>
107. Kabelitz D (2020) Gamma Delta T Cells ($\gamma\delta$ T Cells) in Health and Disease: In Memory of Professor Wendy Havran. *Cells* 9:. <https://doi.org/10.3390/cells9122564>
108. Lu H, Li DJ, Jin LP (2016) $\gamma\delta$ Cells and Related Diseases. *Am J Reprod Immunol* 75:609–618.
<https://doi.org/10.1111/aji.12495>
109. Neier SC, Ferrer A, Wilton KM, et al (2020) The early proximal $\alpha\beta$ TCR signalosome specifies thymic selection outcome through a quantitative protein interaction

network Steven. *Sci Immunol* 4:1–33.
<https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aal2201>.The

110. Glassman CR, Parrish HL, Lee MS, Kuhns MS (2018) Reciprocal TCR-CD3 and CD4 Engagement of a Nucleating pMHCII Stabilizes a Functional Receptor Macrocomplex. *Cell Rep* 22:1263–1275.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.104>
111. Hsu H, Carisey AF, Orange JS (2017) The Immune Synapse. *1584*:497–515. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6881-7>
112. Palmer E (2003) Negative selection - Clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat. Rev. Immunol.* 3:383–391
113. Kumar B V, Connors T, Farber DL (2018) Human T cell development, localization, and function throughout life. *Immunity* 48:202–213.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007>
114. Nitta T, Murata S, Ueno T, et al (2008) Thymic Microenvironments for T-Cell Repertoire Formation. *Adv. Immunol.* 99:59–94
115. Gatzka M, Walsh CM (2007) Apoptotic signal transduction and T cell tolerance. *Autoimmunity* 40:442–452
116. Marrack P, Bender J, Hildeman D, et al (2000) Homeostasis of $\alpha\beta$ TCR⁺ T cells. *Nat Immunol* 1:107–111. <https://doi.org/10.1038/77778>

117. Saito T (2019) Molecular dynamics of co-signal molecules in T-cell activation. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, pp 135–152
118. Kuklina EM (2013) Molecular mechanisms of T-cell anergy. *Biochem*. 78:144–156
119. Laufer JM, Legler DF (2018) Beyond migration—Chemokines in lymphocyte priming, differentiation, and modulating effector functions. *J. Leukoc. Biol.* 104:301–312
120. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG (2014) T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.011>
121. Zhou L, Chong MMW, Littman DR (2009) Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity* 30:646–655
122. Liu W, Putnam AL, Xu-yu Z, et al (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 203:1701–1711.
<https://doi.org/10.1084/jem.20060772>
123. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2017) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 198:986–992.
<https://doi.org/10.1038/ni904>

124. Zhang S, Zhang H, Zhao J (2009) The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation. *Biochem Biophys Res Commun* 384:405–408.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.04.134>
125. Golstein P, Griffiths GM (2018) An early history of T cell-mediated cytotoxicity. *Nat Rev Immunol* 18:527–535.
<https://doi.org/10.1038/s41577-018-0009-3>
126. Larbi A, Fulop T (2014) From “truly naïve” to “exhausted senescent” T cells: When markers predict functionality. *Cytom Part A* 85:25–35.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.22351>
127. Nunes C, Wong R, Mason M, et al (2012) Expansion of a CD8⁺PD-1⁺ + replicative senescence phenotype in early stage CLL patients is associated with inverted CD4:CD8 ratios and disease progression. *Clin Cancer Res* 18:678–687.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2630>
128. Sharpe AH (2009) Mechanisms of costimulation. *Immunol. Rev.* 229:5–11
129. Fujimoto M, Poe JC, Hasegawa M, Tedder TF (2000) CD19 regulates intrinsic B lymphocyte signal transduction and activation through a novel mechanism of processive amplification. In: *Immunologic Research*. *Immunol Res*, pp 281–298
130. Cyster JG, Allen CDC (2019) B cell responses–Cell interaction dynamics and decisions. *Cell* 177:524–540.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.016>

131. Cannons JL, Qi H, Lu KT, et al (2010) Optimal Germinal Center Responses Require a Multistage T Cell:B Cell Adhesion Process Involving Integrins, SLAM-Associated Protein, and CD84. *Immunity* 32:253–265.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.01.010>
132. Methot SP, Di Noia JM (2017) Molecular Mechanisms of Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. In: *Advances in Immunology*. Academic Press Inc., pp 37–87
133. Stavnezer J, Guikema JEJ, Schrader CE (2008) Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu. Rev. Immunol.* 26:261–292
134. Kraft S, Kinet JP (2007) New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* 7:365–378
135. Defrance T, Taillardet M, Genestier L (2011) T cell-independent B cell memory. *Curr Opin Immunol* 23:330–336. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.03.004>
136. Rosser EC, Mauri C (2015) Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity* 42:607–612
137. Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E (2007) Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. *Nat. Rev. Immunol.* 7:213–219
138. Clegg A, Young J, Iliffe S, et al (2013) Frailty in elderly people. In: *The Lancet*. Elsevier B.V., pp 752–762

139. Dziechciaż M, Filip R (2014) Biological psychological and social determinants of old age: Bio-psycho-social aspects of human aging. *Ann Agric Environ Med* 21:835–838. <https://doi.org/10.5604/12321966.1129943>
140. Obas V, Ramachandran SV (2018) The aging heart. *Clin Sci (Lond)* 132:1367–1382. <https://doi.org/10.1042/CS20171156>
141. Khan SS, Singer BD, Vaughan DE (2017) Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans. *Aging Cell* 16:624–633
142. Taylor B, Johnson B (2010) The pulmonary circulation and exercise responses in the elderly. *Semin Respir Crit Care Med* 31:528–538. <https://doi.org/10.1055/S-0030-1265894>
143. Veldhuizen R, McCaig L, Pape C, Gill S (2019) The effects of aging and exercise on lung mechanics, surfactant and alveolar macrophages. *Exp Lung Res* 45:113–122. <https://doi.org/10.1080/01902148.2019.1605633>
144. Brivio P, Paladini MS, Racagni G, et al (2019) From Healthy Aging to Frailty: In Search of the Underlying Mechanisms. *Curr Med Chem* 26:3685–3701. <https://doi.org/10.2174/0929867326666190717152739>
145. Groarke E, Young N (2019) Aging and Hematopoiesis. *Clin Geriatr Med* 35:285–293. <https://doi.org/10.1016/J.CGEM.2019.03.001>

146. Fulop T (2020) Immunosenescence is both functional / adaptive and dysfunctional / maladaptive. *Semin Immunopathol* 42:521–536.
<https://doi.org/doi/10.1007/s00281-020-00818-9>
147. Franceschi C, Campisi J (2014) Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *Journals Gerontol* 69:4–9.
<https://doi.org/10.1093/gerona/glu057>
148. Distefano G, Goodpaster B (2018) Effects of Exercise and Aging on Skeletal Muscle. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8:
<https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A029785>
149. Livshits G, Kalinkovich A (2019) Inflammaging as a common ground for the development and maintenance of sarcopenia, obesity, cardiomyopathy and dysbiosis. *Ageing Res Rev* 56:
<https://doi.org/10.1016/J.ARR.2019.100980>
150. Pasco J, Mohebbi M, Holloway K, et al (2017) Musculoskeletal decline and mortality: prospective data from the Geelong Osteoporosis Study. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 8:482–489.
<https://doi.org/10.1002/JCSM.12177>
151. Senderovich H, Tang H, Belmont S (2017) The Role of Exercises in Osteoporotic Fracture Prevention and Current Care Gaps. Where Are We Now? Recent Updates. *Rambam Maimonides Med J* 8:e0032.
<https://doi.org/10.5041/RMMJ.10308>

152. Lewicky-Gaupp C, Hamilton Q, Ashton-Miller J, et al (2009) Anal sphincter structure and function relationships in aging and fecal incontinence. *Am J Obstet Gynecol* 200:559.e1-559.e5.
<https://doi.org/10.1016/J.AJOG.2008.11.009>
153. Ragonnaud E, Biragyn A (2021) Gut microbiota as the key controllers of “healthy” aging of elderly people. *Immun Ageing* 18:. <https://doi.org/10.1186/S12979-020-00213-W>
154. Tajiri K, Shimizu Y (2013) Liver physiology and liver diseases in the elderly. *World J Gastroenterol* 19:8459–8467. <https://doi.org/10.3748/WJG.V19.I46.8459>
155. Denic A, Lieske J, Chakkera H, et al (2017) The Substantial Loss of Nephrons in Healthy Human Kidneys with Aging. *J Am Soc Nephrol* 28:313–320.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2016020154>
156. Russell-Goldman E, Murphy G (2020) The Pathobiology of Skin Aging: New Insights into an Old Dilemma. *Am J Pathol* 190:1356–1369.
<https://doi.org/10.1016/J.AJPATH.2020.03.007>
157. Clerencia-Sierra M, Ioakeim-Skoufa I, Poblador-Plou B, et al (2020) Do Centenarians Die Healthier than Younger Elders? A Comparative Epidemiological Study in Spain. *J Clin Med* 9:1563. <https://doi.org/10.3390/JCM9051563>
158. Milman S, Atzmon G, Crandall J, Barzilai N (2014) Phenotypes and genotypes of high density lipoprotein

cholesterol in exceptional longevity. *Curr Vasc Pharmacol* 12:690–697.

<https://doi.org/10.2174/1570161111666131219101551>

159. Zhu Z, Xia W, Cui Y, et al (2019) Klotho gene polymorphisms are associated with healthy aging and longevity: Evidence from a meta-analysis. *Mech Ageing Dev* 178:33–40.
<https://doi.org/10.1016/J.MAD.2018.12.003>
160. de Cabo R, Mattson MP (2019) Effects of Intermittent Fasting on Health, Aging, and Disease. *N Engl J Med* 381:2541–2551. <https://doi.org/10.1056/nejmra1905136>
161. Willcox D, Willcox B, Todoriki H, et al (2006) Caloric restriction and human longevity: what can we learn from the Okinawans? *Biogerontology* 7:173–177.
<https://doi.org/10.1007/S10522-006-9008-Z>
162. Pallis AG, Hatse S, Brouwers B, et al (2014) Evaluating the physiological reserves of older patients with cancer: The value of potential biomarkers of aging? *J. Geriatr. Oncol.* 5
163. Hamaker ME, Wildes TM, Rostoft S (2017) Time to stop saying geriatric assessment is too time consuming. *J Clin Oncol* 35:2871–2874.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2017.72.8170>
164. Balducci L, Beghe C (2000) The application of the principles of geriatrics to the management of the older person with cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*

165. Palmer K, Onder G (2018) Comprehensive geriatric assessment: Benefits and limitations. *Eur J Intern Med* 54:e8–e9. <https://doi.org/10.1016/J.EJIM.2018.02.016>
166. Parker S, McCue P, Phelps K, et al (2018) What is Comprehensive Geriatric Assessment (CGA)? An umbrella review. *Age Ageing* 47:149–155. <https://doi.org/10.1093/AGEING/AFX166>
167. Clegg A, Young J, Iliffe S, et al (2014) Frailty in elderly people. *Lancet* 381:752–762. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62167-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62167-9).Frailty
168. Wagner KH, Cameron-Smith D, Wessner B, Franzke B (2016) Biomarkers of aging: From function to molecular biology. *Nutrients* 8
169. Hartmann A, Hartmann C, Secci R, et al (2021) Ranking Biomarkers of Aging by Citation Profiling and Effort Scoring. *Front Genet* 12:. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.686320>
170. Aunan JR, Watson MM, Hagland HR, Søreide K (2016) Molecular and biological hallmarks of ageing. *Br. J. Surg.* 103:e29–e46
171. López-Otín C, Blasco M, Partridge L, et al (2013) The hallmarks of aging. *Cell* 153:1194. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.05.039>
172. Kowald A, Passos JF, Kirkwood TBL (2020) On the evolution of cellular senescence. *Aging Cell* 19:1–12.

<https://doi.org/10.1111/accel.13270>

173. Ndifon W, Dushoff J (2016) The Hayflick Limit May Determine the Effective Clonal Diversity of Naive T Cells. *J Immunol* 196:4999–5004.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502343>
174. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M (2018) Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol* 28:436–453. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>
175. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144:646–674.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
176. Fulop T, McElhane J, Pawelec G, et al (2015) Frailty, Inflammation and Immunosenescence. *Interdiscip Top Gerontol Geriatr* 41:26–40.
<https://doi.org/10.1159/000381134>
177. Pawelec G (2012) Hallmarks of human “immunosenescence”: adaptation or dysregulation? *Immun Ageing* 9:15. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-9-15>
178. Perim Rodrigues L, Rodrigues Teixeira V, Alencar-Silva T, et al (2021) Hallmarks of aging and immunosenescence: Connecting the dots. *Cytokine Growth Factor Rev* 59:9–21.
<https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2021.01.006>
179. Fulop T, Witkowski JM, Pawelec G, et al (2014) On the immunological theory of aging. In: *Aging: Facts and*

Theories. pp 163–176

180. Wikby A, Strindhall J, Johansson B (2009) The immune risk profile and associated parameters in late life: Lessons from the OCTO and NONA longitudinal studies. *Handb Immunosenescence Basic Underst Clin Appl* 3–28. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9063-9-1>
181. Strindhall J, Nilsson BO, Löfgren S, et al (2007) No Immune Risk Profile among individuals who reach 100 years of age: Findings from the Swedish NONA immune longitudinal study. *Exp Gerontol* 42:753–761. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.05.001>
182. Muller GC, Gottlieb MG, Luz Correa B, et al (2015) The inverted CD4: CD8 ratio is associated with gender-related changes in oxidative stress during aging. *Cell Immunol* 296:149–154. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.05.006>
183. Adriaensen W, Derhovanessian E, Vaes B, et al (2015) CD4:8 ratio >5 is associated with a dominant naive t-cell phenotype and impaired physical functioning in CMV-seropositive very elderly people: Results from the BELFRAIL study. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci* 70:143–154. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu018>
184. Alpert A, Pickman Y, Leipold M, et al (2019) A clinically meaningful metric of immune age derived from high-dimensional longitudinal monitoring. *Nat Med* 25:487–495. <https://doi.org/10.1038/S41591-019-0381-Y>

185. Ventura MT, Casciaro M, Gangemi S, Buquicchio R (2017) Immunosenescence in aging: Between immune cells depletion and cytokines up-regulation. *Clin Mol Allergy* 15:. <https://doi.org/10.1186/s12948-017-0077-0>
186. Oh S, Lee J, Shin O (2019) Aging and the Immune System: the Impact of Immunosenescence on Viral Infection, Immunity and Vaccine Immunogenicity. *Immune Netw* 19:. <https://doi.org/10.4110/IN.2019.19.E37>
187. Fulop T, Larbi A, Dupuis G, et al (2018) Immunosenescence and Inflamm-Aging As Two Sides of the Same Coin: Friends or Foes? *Front Immunol* 8:1960. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01960>
188. Xia S, Zhang X, Zheng S, et al (2016) An Update on Inflamm-Aging: Mechanisms, Prevention, and Treatment. *J Immunol Res* 2016:1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/8426874>
189. Liu JP (2017) Aging mechanisms and intervention targets. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 44:3–8
190. Fülöp T, Montgomery RR (2014) Editorial overview: Immune senescence: Known knowns and unknown unknowns. *Curr Opin Immunol* 29:6–9. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.06.005>
191. Naumova E, Pawelec G, Mihaylova A (2016) Natural killer cells, ageing and cancer. *Cancer Immunol Immunother* 65:367–370. <https://doi.org/10.1007/s00262->

016-1817-6

192. Tarazona R, Sanchez-Correa B, Casas-Avilés I, et al (2017) Immunosenescence: limitations of natural killer cell-based cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 66:233–245. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1882-x>
193. Gayoso I, Sanchez-Correa B, Campos C, et al (2011) Immunosenescence of human natural killer cells. *J Innate Immun* 3:337–343. <https://doi.org/10.1159/000328005>
194. Rodriguez IJ, Lalinde Ruiz N, Llano León M, et al (2021) Immunosenescence Study of T Cells: A Systematic Review. *Front Immunol* 11:1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604591>
195. Wensveen FM, Unger P-PA, Kragten NAM, et al (2012) CD70-Driven Costimulation Induces Survival or Fas-Mediated Apoptosis of T Cells Depending on Antigenic Load. *J Immunol* 188:4256–4267. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102889>
196. Sanderson SL, Simon AK (2017) In aged primary T cells, mitochondrial stress contributes to telomere attrition measured by a novel imaging flow cytometry assay. *Aging Cell* 16:1234. <https://doi.org/10.1111/ACEL.12640>
197. Buchan S, Manzo T, Flutter B, et al (2015) OX40- and CD27-mediated co-stimulation synergize with anti-PD-L1 blockade by forcing exhausted CD8⁺ T cells to exit

- quiescence. *J Immunol* 194:125.
<https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1401644>
198. Buchan SL, Fallatah M, Thirdborough SM, et al (2018) PD-1 blockade and CD27 stimulation activate distinct transcriptional programs that synergize for CD8+ T-cell driven anti-tumor immunity. *Clin Cancer Res* 24:2383.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3057>
199. Onyema OO, Njemini R, Forti LN, et al (2015) Aging-associated subpopulations of human CD8+ T-lymphocytes identified by their CD28 and CD57 phenotypes. *Arch Gerontol Geriatr* 61:494–502.
<https://doi.org/10.1016/J.ARCHGER.2015.08.007>
200. Quinn KM, Linterman MA (2020) Senescence blurs the line between innate and adaptive immune cells. *Immunol Cell Biol* 98:431–433. <https://doi.org/10.1111/imcb.12341>
201. Arosa FA, Solana R, Akbar AN, Pereira BI (2016) Convergence of Innate and Adaptive Immunity during Human Aging. *Front Immunol* 7:445.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00445>
202. Pawelec G (2017) Does the human immune system ever really become “senescent”? *F1000Research* 6:.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.11297.1>
203. Qian Qi, David W. Zhang, Cornelia M. Weyand and JJG (2014) Mechanisms shaping the naïve T cell repertoire in the elderly - Thymic involution or peripheral homeostatic proliferation? *Exp Gerontol* 54:71–74.

<https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

204. Thomas R, Wang W, Su D (2020) Contributions of Age-Related Thymic Involution to Immunosenescence and Inflammaging. *Immun ageing* 17:.
<https://doi.org/10.1186/S12979-020-0173-8>
205. Fuertes Marraco SA, Soneson C, Cagnon L, et al (2015) Long-lasting stem cell-like memory CD8+ T cells with a naïve-like profile upon yellow fever vaccination. *Sci Transl Med* 7:.
<https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAA3700>
206. Fulop T, Witkowski JM, Le Page A, et al (2017) Intracellular signalling pathways: targets to reverse immunosenescence. *Clin Exp Immunol* 187:35–43.
<https://doi.org/10.1111/cei.12836>
207. Derhovanessian E, Chen S, Maier AB, et al (2015) CCR4+ regulatory T cells accumulate in the very elderly and correlate with superior 8-year survival. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci* 70:917–923.
<https://doi.org/10.1093/gerona/glu128>
208. Churov A V., Mamashov KY, Novitskaia A V. (2020) Homeostasis and the functional roles of CD4+ Treg cells in aging. *Immunol Lett* 226:83–89.
<https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2020.07.004>
209. Jagger A, Shimojima Y, Goronzy JJ, Weyand CM (2014) Regulatory T cells and the immune aging process: a mini-review. *Gerontology* 60:130–137.

<https://doi.org/10.1159/000355303>

210. Tan CTY, Wistuba-Hamprecht K, Xu W, et al (2016) $V\delta 2+$ and α/β T cells show divergent trajectories during human aging. *Oncotarget* 7:44906.
<https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.10096>
211. Xu W, Monaco G, Wong EH, et al (2019) Mapping of γ/δ T cells reveals $V\delta 2+$ T cells resistance to senescence. *EBioMedicine* 39:44.
<https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2018.11.053>
212. Stervbo U, Bozzetti C, Baron U, et al (2015) Effects of aging on human leukocytes (part II): immunophenotyping of adaptive immune B and T cell subsets. *Age (Omaha)* 37:. <https://doi.org/10.1007/s11357-015-9829-2>
213. Tucker W, LeBien, Thomas F. Tedder (2008) B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112:1570–1580. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-078071>
214. Lin Y, Kim J, Metter EJ, et al (2016) Changes in blood lymphocyte numbers with age in vivo and their association with the levels of cytokines/cytokine receptors. *Immun Ageing* 13:1–10.
<https://doi.org/10.1186/s12979-016-0079-7>
215. Pawelec G, Bronikowski A, Cunnane SC, et al (2020) The conundrum of human immune system “senescence.” *Mech Ageing Dev* 192:111357.
<https://doi.org/10.1016/J.MAD.2020.111357>

216. Pawelec G (2018) Age and immunity: What is “immunosenesescence”? *Exp Gerontol* 105:4–9. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.10.024>
217. Alam I, Goldeck D, Larbi A, Pawelec G (2013) Aging affects the proportions of T and B cells in a group of elderly men in a developing country—a pilot study from Pakistan. *Age (Omaha)* 35:1521–1530. <https://doi.org/10.1007/s11357-012-9455-1>
218. Alam I, Larbi A, Pawelec G (2012) Nutritional status influences peripheral immune cell phenotypes in healthy men in rural Pakistan. *Immun Ageing* 9:16. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-9-16>
219. Weltevrede M, Eilers R, de Melker HE, van Baarle D (2016) Cytomegalovirus persistence and T-cell immunosenescence in people aged fifty and older: A systematic review. *Exp Gerontol* 77:86–95. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.02.005>
220. Nikolich-Žugich J, van Lier RAW (2017) Cytomegalovirus (CMV) research in immune senescence comes of age: overview of the 6th International Workshop on CMV and Immunosenescence. *GeroScience* 39:245–249. <https://doi.org/10.1007/s11357-017-9984-8>
221. Turner JE, Campbell JP, Edwards KM, et al (2014) Rudimentary signs of immunosenescence in Cytomegalovirus-seropositive healthy young adults. *Age (Omaha)* 36:287–297. <https://doi.org/10.1007/s11357-013-9557-4>

222. Kallemeijn MJ, Boots AMH, Van Der Klift MY, et al (2017) Ageing and latent CMV infection impact on maturation, differentiation and exhaustion profiles of T-cell receptor gammadelta T-cells. *Sci Rep* 7:1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05849-1>
223. Martin-Ruiz C, Hoffmann J, Shmeleva E, et al (2020) CMV-independent increase in CD27–CD28+ CD8+ EMRA T cells is inversely related to mortality in octogenarians. *Aging Mech Dis* 6:. <https://doi.org/10.1038/s41514-019-0041-y>
224. Wistuba-Hamprecht K, Frasca D, Blomberg B, et al (2013) Age-associated alterations in $\gamma\delta$ T-cells are present predominantly in individuals infected with Cytomegalovirus. *Immun Ageing* 10:. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-10-26>
225. Alam I, Larbi A, Pawelec G (2012) Nutritional status influences peripheral immune cell phenotypes in healthy men in rural Pakistan. *Immun Ageing* 9:. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-9-16>
226. Lukito W, Wattanapenpaiboon N, Savige GS, et al (2004) Nutritional indicators, peripheral blood lymphocyte subsets and survival in an institutionalised elderly population. *Asia Pac J Clin Nutr* 13:107–112
227. Chandra R (2002) Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur J Clin Nutr* 56:S73–S76. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601492>

228. Frasca D, Diaz A, Romero M, Blomberg BB (2017) Ageing and obesity similarly impair antibody responses. *Clin Exp Immunol* 187:64–70. <https://doi.org/10.1111/CEI.12824>
229. Frasca D, Diaz A, Romero M, Blomberg BB (2020) Leptin induces immunosenescence in human B cells. *Cell Immunol* 348:. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.103994>
230. Duggal NA, Niemi G, Harridge SDR, et al (2019) Can physical activity ameliorate immunosenescence and thereby reduce age-related multi-morbidity? *Nat Rev Immunol* 19:563–572. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0177-9>
231. Weyh C, Krüger K, Strasser B (2020) Physical activity and diet shape the immune system during aging. *Nutrients* 12:1–17. <https://doi.org/10.3390/nu12030622>
232. Donovan T, Bain AL, Tu W, et al (2021) Influence of Exercise on Exhausted and Senescent T Cells: A Systematic Review. *Front Physiol* 12:668327. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2021.668327>
233. Moskalev A, Stambler I, Caruso C (2020) Innate and Adaptive Immunity in Aging and Longevity: The Foundation of Resilience. *Aging Dis* 11:1363–1373. <https://doi.org/10.14336/AD.2020.0603>
234. Papp G, Szabó K, Jámbor I, et al (2021) Regular Exercise May Restore Certain Age-Related Alterations of

Adaptive Immunity and Rebalance Immune Regulation.
Front Immunol 12:1.

<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.639308>

235. Schulz A, Mälzer J, Domingo C, et al (2015) Low Thymic Activity and Dendritic Cell Numbers Are Associated with the Immune Response to Primary Viral Infection in Elderly Humans. *J Immunol* 195:4699–4711.
<https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1500598>
236. Fülöp T, Dupuis G, Witkowski JM, Larbi A (2016) The role of immunosenescence in the development of age-related diseases. *Rev Investig Clin* 68:84–91
237. Liang Z, Zhao Y, Ruan L, et al (2017) Impact of aging immune system on neurodegeneration and potential immunotherapies. *Prog Neurobiol* 157:2–28.
<https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2017.07.006>
238. Ray D, Yung R (2018) Immune Senescence, Epigenetics and Autoimmunity. *Clin Immunol* 196:59.
<https://doi.org/10.1016/J.CLIM.2018.04.002>
239. Lian J, Yue Y, Yu W, Zhang Y (2020) Immunosenescence: a key player in cancer development. *J Hematol Oncol* 13:.
<https://doi.org/10.1186/S13045-020-00986-Z>
240. Santoro A, Bientinesi E, Monti D (2021) Immunosenescence and inflammaging in the aging process: age-related diseases or longevity? *Ageing Res Rev* 71:1014–1022.

<https://doi.org/10.1016/J.ARR.2021.101422>

241. Finn OJ (2012) Immuno-oncology: Understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol* 23:8–11.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mds256>
242. Fülöp T, Larbi A, Exterman M, et al (2013) Aging, Immunosenescence, and Cancer. Elsevier
243. Peng B, Wang Y-H, Liu Y-M, Ma L-X (2015) Prognostic significance of the neutrophil to lymphocyte ratio in patients with non-small cell lung cancer: a systemic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 8:3098–106
244. Tokunaga R, Sakamoto Y, Nakagawa S, et al (2017) Comparison of systemic inflammatory and nutritional scores in colorectal cancer patients who underwent potentially curative resection. *Int J Clin Oncol*.
<https://doi.org/10.1007/s10147-017-1102-5>
245. Sacdalan DB, Lucero JA, Sacdalan DL (2018) Prognostic utility of baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients receiving immune checkpoint inhibitors: A review and meta-analysis. *Onco Targets Ther* 11:955–965.
<https://doi.org/10.2147/OTT.S153290>
246. Allen BM, Hiam KJ, Burnett CE, et al (2020) Systemic dysfunction and plasticity of the immune macroenvironment in cancer models. *Nat Med* 26:1125.
<https://doi.org/10.1038/S41591-020-0892-6>

247. Hiam-Galvez KJ, Allen BM, Spitzer MH (2021) Systemic immunity in cancer. *Nat Rev Cancer* 21:345–359.
<https://doi.org/10.1038/s41568-021-00347-z>
248. Hou P-F, Zhu L-J, Chen X-Y, Qiu Z-Q (2017) Age-related changes in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells and their relationship with lung cancer. *PLoS One* 12:e0173048.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0173048>
249. Stankovic B, Bjørhovde HAK, Skarshaug R, et al (2018) Immune Cell Composition in Human Non-small Cell Lung Cancer. *Front Immunol* 9:3101.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03101>
250. Gong Z, Jia Q, Chen J, et al (2019) Impaired Cytolytic Activity and Loss of Clonal Neoantigens in Elderly Patients With Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 14:857–866. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.01.024>
251. Hofman P (2020) New insights into the interaction of the immune system with non-small cell lung carcinomas. *Transl Lung Cancer Res* 9:2199–2213.
<https://doi.org/10.21037/tlcr-20-178>
252. Generalitat Valenciana Departament de Salut de València Doctor Peset.
http://doctorpeset.san.gva.es/nuestro_departamento.
Accessed 7 Oct 2021
253. Kalsi T, Babic-Illman G, Ross PJ, et al (2015) The impact of comprehensive geriatric assessment interventions on

- tolerance to chemotherapy in older people. *Br J Cancer* 112:1435–1444. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.120>
254. Velghe A, Petrovic M, De Buyser S, et al (2014) Validation of the G8 screening tool in older patients with aggressive haematological malignancies. *Eur J Oncol Nurs* 18:645–648. <https://doi.org/10.1016/j.ejon.2014.05.006>
255. Ferrat E, Paillaud E, Caillet P, et al (2017) Performance of four frailty classifications in older patients with cancer: Prospective elderly cancer patients cohort study. *J Clin Oncol* 35:766–777. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.69.3143>
256. Faul F, Erdfelder E, Lang A-G, Buchner A (2007) G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 39:175–191. <https://doi.org/10.3758/BF03193146>
257. Fearon K, Strasser F, Anker SD, et al (2011) Definition and classification of cancer cachexia: An international consensus. *Lancet Oncol* 12:489–495. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70218-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70218-7)
258. Buccheri G, Ferrigno D, Tamburini M (1996) Karnofsky and ECOG performance status scoring in lung cancer: A prospective, longitudinal study of 536 patients from a single institution. *Eur J Cancer* 32:1135–1141. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(95\)00664-8](https://doi.org/10.1016/0959-8049(95)00664-8)

259. Bakhshandeh Bavarsad M, Foroughan M, Zanjari N, et al (2021) Psychometric properties of modified MOS social support survey 5-item (MSSS-5-item) among Iranian older adults. *BMC Geriatr* 21:1–10.
<https://doi.org/10.1186/s12877-021-02353-0>
260. Petit-Monéger A, Rainfray M, Soubeyran P, et al (2016) Detection of frailty in elderly cancer patients: Improvement of the G8 screening test. *J Geriatr Oncol* 7:99–107. <https://doi.org/10.1016/j.jgo.2016.01.004>
261. Martínez De La Iglesia J, Herrero RD, Vilches MCO, et al (2001) Adaptación y validación al castellano del cuestionario de Pfeiffer (SPMSQ) para detectar la existencia de deterioro cognitivo en personas mayores de 65 años. *Med Clin (Barc)* 117:129–134.
[https://doi.org/10.1016/s0025-7753\(01\)72040-4](https://doi.org/10.1016/s0025-7753(01)72040-4)
262. Lobo A, Saz P, Marcos G, et al (1998) Revalidation and standardization of the cognition mini-exam (first Spanish version of the Mini-Mental Status Examination) in the general geriatric population]. *Med Clin (Barc)* 112:767–774
263. Molina-Garrido MJ, Guillén-Ponce C (2011) Development of a cancer-specific Comprehensive Geriatric Assessment in a University Hospital in Spain. *Crit Rev Oncol Hematol* 77:148–161.
<https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2010.02.006>
264. Ganti AK, Siedlik E, Marr AS, et al (2011) Predictive ability of Charlson comorbidity index on outcomes from

- lung cancer. *Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials*.
<https://doi.org/10.1097/COC.0b013e3181fe445b>
265. Parmelee PA, Thuras PD, Katz IR, Lawton MP (1995) Validation of the Cumulative Illness Rating Scale in a Geriatric Residential Population. *J Am Geriatr Soc* 43:130–137. <https://doi.org/10.1111/J.1532-5415.1995.TB06377.X>
266. Ferrat E, Paillaud E, Caillet P, et al (2017) Performance of four frailty classifications in older patients with cancer: Prospective elderly cancer patients cohort study. *J Clin Oncol* 35:766–777.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2016.69.3143>
267. Molina-Garrido MJ, Guillén-Ponce C, Blanco R, et al (2018) Delphi consensus of an expert committee in oncogeriatrics regarding comprehensive geriatric assessment in seniors with cancer in Spain. *J Geriatr Oncol* 9:337–345.
<https://doi.org/10.1016/j.jgo.2017.11.012>
268. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, et al (2016) The IASLC lung cancer staging project: Proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM Classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* 11:39–51.
<https://doi.org/10.1016/j.jtho.2015.09.009>
269. Law JP, Hirschhorn DF, Owen RE, et al (2009) The importance of Foxp3 antibody and fixation/permeabilization buffer combinations in

- identifying CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells.
Cytometry A 75:1040.
<https://doi.org/10.1002/CYTO.A.20815>
270. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, et al (2017) Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* 37:163–176.
<https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
271. Bhowmick D, Sheridan RTC, Bushnell TP, Spalding KL (2020) Practical Guidelines for Optimization and Characterization of the Beckman Coulter CytoFLEX™ Platform. *Cytom Part A* 97:800–810.
<https://doi.org/10.1002/CYTO.A.23998>
272. Citómetros de flujo, reactivos, software - Beckman Coulter. <https://www.beckman.es/flow-cytometry/instruments>. Accessed 12 Oct 2021
273. Cossariza A, Chang H-D, Radbrush A, et al (2019) Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur J Immunol* 49:1457–1973.
<https://doi.org/10.1002/eji.201970107.Guidelines>
274. McCoy JP, Ziqing C, Lundqvist A, Witt K (2019) Immunophenotyping. *Methods and Protocols*
275. van Buuren S, Groothuis-Oudshoorn K (2011) mice: Multivariate Imputation by Chained Equations in R. *J Stat Softw* 45:1–67. <https://doi.org/10.18637/JSS.V045.I03>
276. Kruskal WH, Wallis WA (1952) Use of Ranks in One-

- Criterion Variance Analysis. *J Am Stat Assoc* 47:583.
<https://doi.org/10.2307/2280779>
277. Spearman C (1904) The Proof and Measurement of Association between Two Things. *Am J Psychol* 15:72.
<https://doi.org/10.2307/1412159>
278. Cramér H (1946) *Mathematical methods of statistics*. In: Princeton: Princeton University Press. Princeton University Press, p 282
279. Jackson JE (2005) *A user's guide to principal components*. Wiley-Interscience
280. Hopkins B, Skellam JG (1954) A New Method for determining the Type of Distribution of Plant Individuals. *Ann Bot* 18:213–227.
<https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.AOB.A083391>
281. Rousseeuw PJ (1987) Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *J Comput Appl Math* 20:53–65. [https://doi.org/10.1016/0377-0427\(87\)90125-7](https://doi.org/10.1016/0377-0427(87)90125-7)
282. MacQueen J (1967) Some methods for classification and analysis of multivariate observations. In: *Proceedings of 5th Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability*. University of California Press, pp 281–298
283. Park HS, Jun CH (2009) A simple and fast algorithm for K-medoids clustering. *Expert Syst Appl* 36:3336–3341.
<https://doi.org/10.1016/J.ESWA.2008.01.039>

284. Ward JH (1963) Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *J Am Stat Assoc* 58:236–244.
<https://doi.org/10.1080/01621459.1963.10500845>
285. Bezdek JC, Ehrlich R, Full W (1984) FCM: The fuzzy c-means clustering algorithm. *Comput Geosci* 10:191–203.
[https://doi.org/10.1016/0098-3004\(84\)90020-7](https://doi.org/10.1016/0098-3004(84)90020-7)
286. Shi J, Malik J (2000) Normalized Cuts and Image Segmentation. *IEEE Trans PAMI* 22:888–905
287. Ståhle L, Wold S (1987) Partial least squares analysis with cross-validation for the two-class problem: A Monte Carlo study. *J Chemom* 1:185–196.
<https://doi.org/10.1002/CEM.1180010306>
288. Wold H (1985) Partial least squares. In: Kotz S, Johnson NL (eds) *Encyclopedia of statistical sciences*, 6th ed. New York, pp 581–591
289. Fisher RA (1922) On the Interpretation of χ^2 from Contingency Tables, and the Calculation of P. *J R Stat Soc* 85:94. <https://doi.org/10.2307/2340521>
290. Kuijpers TW, Vossen MT, Gent M-R, et al (2003) Frequencies of Circulating Cytolytic, CD45RA + CD27 – , CD8 + T Lymphocytes Depend on Infection with CMV . *J Immunol* 170:4342–4348.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.8.4342>
291. Provinciali M, Moresi R, Donnini A, Lisa RM (2009) Reference values for CD4+ and CD8+ T lymphocytes with naïve or memory phenotype and their association

with mortality in the elderly. *Gerontology* 55:314–321.
<https://doi.org/10.1159/000199451>

292. National Cancer Institute (2022) SEER.
https://seer.cancer.gov/explorer/application.html?site=47&data_type=1&graph_type=2&compareBy=sex&chk_sex_3=3&chk_sex_2=2&rate_type=2&race=1&age_range=1&stage=101&advopt_precision=1&advopt_show_ci=on&advopt_display=2. Accessed 17 Feb 2022
293. Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP (2019) Global Epidemiology of Lung Cancer. *Ann Glob Heal* 85:1–16.
<https://doi.org/10.5334/aogh.2419>
294. Islami F, Torre LA, Jemal A (2015) Global trends of lung cancer mortality and smoking prevalence. *Transl Lung Cancer Res* 4:327. <https://doi.org/10.3978/J.ISSN.2218-6751.2015.08.04>
295. Provencio M, Carcereny E, Rodríguez-Abreu D, et al (2019) Lung cancer in Spain: information from the Thoracic Tumors Registry (TTR study). *Transl Lung Cancer Res* 8:461.
<https://doi.org/10.21037/TLCR.2019.08.05>
296. Pinilla J, Abásolo I (2017) The effect of policies regulating tobacco consumption on smoking initiation and cessation in Spain: is it equal across socioeconomic groups? *Tob Induc Dis* 15:
<https://doi.org/10.1186/S12971-016-0109-4>
297. Brule SY, Al-Baimani K, Jonker H, et al (2016) Palliative

- systemic therapy for advanced non-small cell lung cancer: Investigating disparities between patients who are treated versus those who are not. *Lung Cancer* 97:15–21. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.04.007>
298. Morel H, Raynard B, d’Arlhac M, et al (2018) Prediagnosis weight loss, a stronger factor than BMI, to predict survival in patients with lung cancer. *Lung Cancer* 126:55–63. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.07.005>
299. Prado CM, Cushen SJ, Orsso CE, Ryan AM (2016) Sarcopenia and cachexia in the era of obesity: Clinical and nutritional impact. *Proc Nutr Soc* 75:188–198. <https://doi.org/10.1017/S0029665115004279>
300. Zhang X, Sun M, McKoy JM, et al (2018) Malnutrition in older patients with cancer: Appraisal of the Mini Nutritional Assessment, weight loss, and body mass index. *J Geriatr Oncol* 9:81–83. <https://doi.org/10.1016/j.jgo.2017.07.012>
301. Kimura M, Naito T, Kenmotsu H, et al (2015) Prognostic impact of cancer cachexia in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Support Care Cancer* 23:1699–1708. <https://doi.org/10.1007/s00520-014-2534-3>
302. van der Meij BS, Schoonbeek CP, Smit EF, et al (2013) Pre-cachexia and cachexia at diagnosis of stage III non-small-cell lung carcinoma: an exploratory study comparing two consensus-based frameworks. *Br J Nutr* 109:2231–2239. <https://doi.org/10.1017/S0007114512004527>

303. Alifano M, Mansuet-Lupo A, Lococo F, et al (2014) Systemic inflammation, nutritional status and tumor immune microenvironment determine outcome of resected non-small cell lung cancer. *PLoS One* 9:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106914>
304. Wang G, Li X, Xiong R, et al (2020) Long-term survival analysis of patients with non-small cell lung cancer complicated with type 2 diabetes mellitus. *Thorac cancer* 11:1309–1318. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13398>
305. Jacobi O, Landman Y, Reinhorn D, et al (2021) The Relationship of Diabetes Mellitus to Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncology* 99:555–561. <https://doi.org/10.1159/000516671>
306. Zhu L, Cao H, Zhang T, et al (2016) The Effect of Diabetes Mellitus on Lung Cancer Prognosis: A PRISMA-compliant Meta-analysis of Cohort Studies. *Medicine (Baltimore)* 95:. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003528>
307. Bi G, Yao G, Bian Y, et al (2020) The Effect of Diabetes Mellitus on Prognosis of Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 26:1–12. <https://doi.org/10.5761/ATCS.RA.19-00170>
308. Qian J, Wang W, Wang L, et al (2021) The Survival Benefit for Optimal Glycemic Control in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients With Preexisting

Diabetes Mellitus. *Front Oncol* 11:745150.

<https://doi.org/10.3389/FONC.2021.745150/FULL>

309. Herrero Rivera D, Nieto-Guerrero Gómez JM, Cacicedo Fernández de Bobadilla J, et al (2019) Cardiovascular disease and survival in non-small cell lung cancer: a multicenter prospective assessment. *Clin Transl Oncol* 21:1220–1230. <https://doi.org/10.1007/S12094-019-02047-5>
310. Kravchenko J, Berry M, Arbeev K, et al (2015) Cardiovascular comorbidities and survival of lung cancer patients: Medicare data based analysis. *Lung Cancer* 88:85–93. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.01.006>
311. Grose D, Morrison DS, Devereux G, et al (2014) Comorbidities in lung cancer: prevalence, severity and links with socioeconomic status and treatment. *Postgrad Med J* 90:305–310. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2013-132186>
312. Henson LA, Chukwusa E, Ng Yin Ling C, et al (2021) Lung cancer deaths (England 2001-2017)-comorbidities: a national population-based analysis. *BMJ Support Palliat Care* *bmjspcare-2021-003107*. <https://doi.org/10.1136/BMJSPCARE-2021-003107>
313. Hayes-Larson E, Shaw C, Ackley SF, et al (2021) The role of dementia diagnostic delay in the inverse cancer-dementia association. *journals Gerontol* 341:. <https://doi.org/10.1093/GERONA/GLAB341>

314. Wildiers H, Heeren P, Puts M, et al (2014) International Society of Geriatric Oncology consensus on geriatric assessment in older patients with cancer. *J Clin Oncol* 32:2595–603. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.8347>
315. Asmis TR, Ding K, Seymour L, et al (2008) Age and comorbidity as independent prognostic factors in the treatment of non small-cell lung cancer: a review of National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group trials. *J Clin Oncol* 26:54–59. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.12.8322>
316. Ding R, Zhu D, He P, et al (2020) Comorbidity in lung cancer patients and its association with medical service cost and treatment choice in China. *BMC Cancer* 20:. <https://doi.org/10.1186/S12885-020-06759-8>
317. Schulkes KJG, Nguyen C, van den Bos F, et al (2016) Selection of Patients in Ongoing Clinical Trials on Lung Cancer. *Lung* 194:967–974. <https://doi.org/10.1007/S00408-016-9943-7>
318. Mihor A, Tomsic S, Zagar T, et al (2020) Socioeconomic inequalities in cancer incidence in Europe: a comprehensive review of population-based epidemiological studies. *Radiol Oncol* 54:1–13. <https://doi.org/10.2478/raon-2020-0008>
319. Bryere J, Dejardin O, Launay L, et al (2018) Socioeconomic status and site-specific cancer incidence, a Bayesian approach in a French Cancer Registries Network study. *Eur J Cancer Prev* 27:391–398.

<https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000326>

320. Redondo-Sánchez D, Marcos-Gragera R, Carulla M, et al (2021) Lung, breast and colorectal cancer incidence by socioeconomic status in Spain: A population-based multilevel study. *Cancers (Basel)* 13:.
<https://doi.org/10.3390/CANCERS13112820/S1>
321. Hovanec J, Siemiatycki J, Conway DI, et al (2018) Lung cancer and socioeconomic status in a pooled analysis of case-control studies. *PLoS One* 13:.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192999>
322. Menvielle G, Boshuizen H, Kunst AE, et al (2010) Occupational exposures contribute to educational inequalities in lung cancer incidence among men: Evidence from the EPIC prospective cohort study. *Int J cancer* 126:1928–1935.
<https://doi.org/10.1002/IJC.24924>
323. Menvielle G, Franck J eve, Radoï L, et al (2016) Quantifying the mediating effects of smoking and occupational exposures in the relation between education and lung cancer: the ICARE study. *Eur J Epidemiol* 31:1213–1221.
<https://doi.org/10.1007/S10654-016-0182-2>
324. Wu Y, Zhu P-Z, Chen Y-Q, et al (2022) Relationship between marital status and survival in patients with lung adenocarcinoma A SEER-based study. *Medicine (Baltimore)* 101:.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000028492>

325. Garrido P, Viñolas N, Isla D, et al (2019) Lung cancer in Spanish women: The WORLD07 project. *Eur J Cancer Care (Engl)* 28:1–7. <https://doi.org/10.1111/ecc.12941>
326. Chen Z, Yin K, Zheng D, et al (2020) Marital status independently predicts non-small cell lung cancer survival: a propensity-adjusted SEER database analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 146:67–74. <https://doi.org/10.1007/S00432-019-03084-X>
327. Requena GC, Salamero M, Gil F (2007) [Validity of the questionnaire MOS-SSS of social support in neoplastic patients]. *Med Clin (Barc)* 128:687–691. <https://doi.org/10.1157/13102357>
328. Masià J, Merchán-Galvis, Salas K, et al (2019) Socio-economic impact on women diagnosed and treated for breast cancer: a cross-sectional study. *Clin Transl Oncol* 21:1736–1745. <https://doi.org/10.1007/S12094-019-02185-W>
329. Costa-Requena G, Ballester Arnal R, Gil F (2015) The influence of coping response and health-related quality of life on perceived social support during cancer treatment. *Palliat Support Care* 13:683–689. <https://doi.org/10.1017/S1478951514000418>
330. Hinz A, Herzberg PY, Lordick F, et al (2019) Age and gender differences in anxiety and depression in cancer patients compared with the general population. *Eur J Cancer Care (Engl)* 28:1–11. <https://doi.org/10.1111/ecc.13129>

331. Shin DW, Park HS, Lee SH, et al (2019) Health-related quality of life, perceived social support, and depression in disease-free survivors who underwent curative surgery only for prostate, kidney and bladder cancer: Comparison among survivors and with the general population. *Cancer Res Treat* 51:289–299.
<https://doi.org/10.4143/CRT.2018.053>
332. Jeppesen SS, Matzen LE, Brink C, et al (2018) Impact of comprehensive geriatric assessment on quality of life, overall survival, and unplanned admission in patients with non-small cell lung cancer treated with stereotactic body radiotherapy. *J Geriatr Oncol* 9:575–582.
<https://doi.org/10.1016/j.jgo.2018.05.009>
333. Couderc AL, Tomasini P, Rey D, et al (2021) Octogenarians treated for thoracic and lung cancers: Impact of comprehensive geriatric assessment. *J Geriatr Oncol* 12:402–409.
<https://doi.org/10.1016/j.jgo.2020.10.005>
334. Repetto L, Fratino L, Audisio RA, et al (2002) Comprehensive geriatric assessment adds information to Eastern Cooperative Oncology Group performance status in elderly cancer patients: an Italian Group for Geriatric Oncology Study. *J Clin Oncol* 20:494–502.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.2.494>
335. Tsubata Y, Shinomiya S, Inoue K, et al (2021) Protocol for a multi-site, cluster-randomized, phase III, comparative clinical trial of geriatric assessment of older

- patients with non-small-cell lung cancer: the ENSURE-GA study. *BMC Geriatr* 21:1–5.
<https://doi.org/10.1186/s12877-021-02028-w>
336. Driessen EJM, Janssen-heijnen MLG, Maas HA, et al (2018) Current Trial Report Study Protocol of the NVALT25-ELDAPT Trial : Selecting the Optimal Treatment for Older Patients With Stage III Non e small-cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer* 19:e849–e852.
<https://doi.org/10.1016/j.clc.2018.07.003>
337. Locher C, Pourel N, Le Caer H, et al (2018) Impact of a comprehensive geriatric assessment to manage elderly patients with locally advanced non-small–cell lung cancers: An open phase II study using concurrent cisplatin–oral vinorelbine and radiotherapy (GFPC 08-06). *Lung Cancer* 121:25–29.
<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.04.017>
338. Schulkes KJG, Souwer ETD, Hamaker ME, et al (2017) The Effect of A Geriatric Assessment on Treatment Decisions for Patients with Lung Cancer. *Lung* 195:225–231. <https://doi.org/10.1007/s00408-017-9983-7>
339. Ørum M, Jensen K, Gregersen M, et al (2019) Impact of comprehensive geriatric assessment on short-term mortality in older patients with cancer—a follow-up study. *Eur J Cancer* 116:27–34.
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.05.003>
340. Guarga L, Ameijide A, Marcos-Gragera R, et al (123AD) Trends in lung cancer incidence by age, sex and

histology from 2012 to 2025 in Catalonia (Spain). *Sci Reports* | 11:23274. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02582-8>

341. Ruano-Ravina A, Provencio M, de Juan VC, et al (2021) Are there differences by sex in lung cancer characteristics at diagnosis? -a nationwide study. *Transl lung cancer Res* 10:3902–3911. <https://doi.org/10.21037/TLCR-21-559>
342. Lantuejoul S, Damotte D, Hofman V, Adam J (2019) Programmed death ligand 1 immunohistochemistry in non-small cell lung carcinoma. *J Thorac Dis* 11:S89. <https://doi.org/10.21037/JTD.2018.12.103>
343. Walters S, Maringe C, Coleman MP, et al (2013) Lung cancer survival and stage at diagnosis in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden and the UK: a population-based study, 2004-2007. *Thorax* 68:551–564. <https://doi.org/10.1136/THORAXJNL-2012-202297>
344. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140:883–899. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.01.025>
345. Schultze-Florey CR, Chukhno E, Goudeva L, et al (2021) Distribution of major lymphocyte subsets and memory T-cell subpopulations in healthy adults employing GLP-conforming multicolor flow cytometry. *Leukemia* 35:. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01348-5>
346. Apoil PA, Puissant-Lubrano B, Congy-Jolivet N, et al

- (2017) Reference values for T, B and NK human lymphocyte subpopulations in adults. *Data Br* 12:400–404. <https://doi.org/10.1016/J.DIB.2017.04.019>
347. Andreu-Ballester JC, García-Ballesteros C, Benet-Campos C, et al (2012) Values for $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T-lymphocytes and CD4+, CD8+, and CD56+ subsets in healthy adult subjects: Assessment by age and gender. *Cytom Part B - Clin Cytom* 82 B:238–244. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21020>
348. Kokuina E, Breff-Fonseca MC, Villegas-Valverde CA, Mora-Díaz I (2019) Normal Values of T, B and NK Lymphocyte Subpopulations in Peripheral Blood of Healthy Cuban Adults. *MEDICC Rev* 21:
349. Miao K, Zhang X, Wang H, et al (2022) Peripheral Blood Lymphocyte Subsets Predict the Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors in Non–Small Cell Lung Cancer. *Front Immunol* 13:912180. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.912180>
350. Yan Y, Wang X, Liu C, Jia J (2022) Association of lymphocyte subsets with efficacy and prognosis of immune checkpoint inhibitor therapy in advanced non-small cell lung carcinoma: a retrospective study. *BMC Pulm Med* 22:. <https://doi.org/10.1186/S12890-022-01951-X>
351. Botafogo V, Pérez-Andres M, Jara-Acevedo M, et al (2020) Age Distribution of Multiple Functionally Relevant Subsets of CD4+ T Cells in Human Blood Using a

Standardized and Validated 14-Color EuroFlow Immune Monitoring Tube. *Front Immunol* 11:.

<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00166/BIBTEX>

352. Gregg R, Smith CM, Clark FJ, et al (2005) The number of human peripheral blood CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells increases with age. *Clin Exp Immunol* 140:540–546. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02798.x>
353. Qiu F, Liang C-L, Liu H, et al (2016) Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: Up and down or upside down? *Oncotarget* 8:268–284. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.13613>
354. Fonseca S, Pereira V, Lau C, et al (2020) Human Peripheral Blood Gamma Delta T Cells: Report on a Series of Healthy Caucasian Portuguese Adults and Comprehensive Review of the Literature. *Cells* 9:.
<https://doi.org/10.3390/CELLS9030729>
355. N C, F D, D W, et al (2006) Sex-specific phenotypical and functional differences in peripheral human Vgamma9/Vdelta2 T cells. *J Leukoc Biol* 79:663–666. <https://doi.org/10.1189/JLB.1105640>
356. Wistuba-Hamprecht K, Di Benedetto S, Schilling B, et al (2016) Phenotypic characterization and prognostic impact of circulating $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T-cells in metastatic malignant melanoma. *Int J Cancer* 138:698–704. <https://doi.org/10.1002/IJC.29818>
357. Bao Y, Guo L, Mo J (2017) Characterization of $\gamma\delta$ T cells

- in patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Lett* 14:1133. <https://doi.org/10.3892/OL.2017.6191>
358. Lee AJ, Kim SG, Chae HD, et al (2012) $\gamma\delta$ T cells are increased in the peripheral blood of patients with gastric cancer. *Clin Chim Acta* 413:1495–1499. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2012.06.016>
359. Fonseca S, Pereira V, Lau C, et al Human Peripheral Blood Gamma Delta T Cells: Report on a Series of Healthy Caucasian Portuguese Adults and Comprehensive Review of the Literature. <https://doi.org/10.3390/cells9030729>
360. Wistuba-Hamprecht K, Gouttefangeas C, Weide B, Pawelec G (2020) Immune Signatures and Survival of Patients With Metastatic Melanoma, Renal Cancer, and Breast Cancer. *Front Immunol* 11:1152. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.01152/BIBTEX>
361. Girard P, Charles J, Cluzel C, et al (2019) The features of circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients display critical perturbations with prognostic impact on clinical outcome. *Oncoimmunology* 8:. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1601483>
362. Campos C, Pera A, Sanchez-Correa B, et al (2014) Effect of age and CMV on NK cell subpopulations. *Exp Gerontol* 54:130–137. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.01.008>
363. Martín-Sánchez JC, Martínez-Sánchez JM, Bilal U, et al

- (2018) Sex and age specific projections of smoking prevalence in Spain: A Bayesian approach. *Nicotine Tob Res* 20:725–730. <https://doi.org/10.1093/NTR/NTX120>
364. Johansen J, Boisen MK, Mellemegaard A, Holm B (2013) Prognostic value of ECOG performance status in lung cancer assessed by patients and physicians. https://doi.org/10.1200/jco20133115_suppl8103 31:8103–8103. https://doi.org/10.1200/JCO.2013.31.15_SUPPL.8103
365. Sánchez-Lara K, Turcott JG, Juárez E, et al (2012) Association of Nutrition Parameters Including Bioelectrical Impedance and Systemic Inflammatory Response With Quality of Life and Prognosis in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Prospective Study. *Nutr Cancer* 64:526–534. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.668744>
366. Altemus M, Sarvaiya N, Epperson CN (2016) Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives. *Pmc* 35:320–330. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.05.004>.Sex
367. Faravelli C, Alessandra Scarpato M, Castellini G, Lo Sauro C (2013) Gender differences in depression and anxiety: The role of age. *Psychiatry Res* 210:1301–1303. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2013.09.027>
368. Chrzastek Z, Guligowska A, Soltysik B, et al (2021) Association of lower nutritional status and education level with the severity of depression symptoms in older

- adults—A cross sectional survey. *Nutrients* 13:1–12.
<https://doi.org/10.3390/nu13020515>
369. Klimova B, Novotny M, Valis M (2020) The impact of nutrition and intestinal microbiome on elderly depression—A systematic review. *Nutrients* 12:.
<https://doi.org/10.3390/nu12030710>
370. Hu T, Xiao J, Peng J, et al (2018) Relationship between resilience, social support as well as anxiety/depression of lung cancer patients: A cross-sectional observation study. *J Cancer Res Ther* 14:72–77.
<https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT>
371. Kishimoto T (2010) IL-6: From its discovery to clinical applications. *Int Immunol* 22:347–352.
<https://doi.org/10.1093/intimm/dxq030>
372. Li Y, Ren H, Cao J (2020) Roles of Interleukin-6-mediated immunometabolic reprogramming in COVID-19 and other viral infection-associated diseases. *Int Immunopharmacol*
373. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T (2014) IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:1–16
374. Sun HB, Zhang YM, Huang LG, et al (2020) The changes of the peripheral CD4+ lymphocytes and inflammatory cytokines in Patients with COVID-19. *PLoS One* 15:1–10.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239532>

375. Eberst G, Vernerey D, Laheurte C, et al (2022) Prognostic value of CD4+ T lymphopenia in non-small cell lung Cancer. *BMC Cancer* 22:1–11. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09628-8>
376. Zhang S, Asquith B, Szydlo R, et al (2021) Peripheral T cell lymphopenia in COVID-19: potential mechanisms and impact. *Immunother Adv* 1:1–18. <https://doi.org/10.1093/immadv/ltab015>
377. Weber R, Groth C, Lasser S, et al (2021) IL-6 as a major regulator of MDSC activity and possible target for cancer immunotherapy. *Cell Immunol* 359:104254. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104254>
378. Lepone LM, Donahue RN, Grenga I, et al (2016) Analyses of 123 Peripheral Human Immune Cell Subsets: Defining Differences with Age and between Healthy Donors and Cancer Patients Not Detected in Analysis of Standard Immune Cell Types. *J Circ Biomarkers* 5:1–17. <https://doi.org/10.5772/62322>
379. Jiao Y, Qiu Z, Xie J, et al (2009) Reference ranges and age-related changes of peripheral blood lymphocyte subsets in Chinese healthy adults. *Sci China C Life Sci* 52:643–50. <https://doi.org/10.1007/s11427-009-0086-4>
380. Le Page A, Dupuis G, Larbi A, et al (2018) Signal transduction changes in CD4+and CD8+T cell subpopulations with aging. *Exp Gerontol* 105:128–139. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.01.005>

381. Jeske SS, Schuler PJ, Doescher J, et al (2020) Age-related changes in T lymphocytes of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Immun Ageing* 17:.. <https://doi.org/10.1186/s12979-020-0174-7>
382. Wertheimer AM, Bennett MS, Park B, et al (2014) Aging and Cytomegalovirus Infection Differentially and Jointly Affect Distinct Circulating T Cell Subsets in Humans. *J Immunol* 192:2143–2155. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301721>
383. Boyd SD, Liu Y, Wang C, et al (2013) Human lymphocyte repertoires in ageing. *Curr Opin Immunol* 25:511–515. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.07.007>
384. Minato N, Hattori M, Hamazaki Y (2020) Physiology and pathology of T-cell aging. *Int Immunol* 32:223–231. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxaa006>
385. Sato K, Kato A, Sekai M, et al (2017) Physiologic Thymic Involution Underlies Age-Dependent Accumulation of Senescence-Associated CD4 + T Cells . *J Immunol* 199:138–148. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1602005/-/DCSUPPLEMENTAL>
386. Hu B, Jadhav RR, Gustafson CE, et al (2020) Distinct Age-Related Epigenetic Signatures in CD4 and CD8 T Cells. *Front Immunol* 11:.. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.585168>
387. Moro-García MA, Alonso-Arias R, López-Larrea C (2013)

When aging reaches CD4+ T-cells: Phenotypic and functional changes. *Front Immunol* 4:1–12.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00107>

388. Tarazona R, Lopez-Sejas N, Guerrero B, et al (2020) Current progress in NK cell biology and NK cell-based cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 69:879–899. <https://doi.org/10.1007/S00262-020-02532-9>
389. Márquez EJ, Trowbridge J, Kuchel GA, et al (2020) The lethal sex gap: COVID-19. *Immun Ageing* 17:1–8. <https://doi.org/10.1186/s12979-020-00183-z>
390. Sanchez-Lara K, Turcott JG, Juarez E, et al (2012) Association of nutrition parameters including bioelectrical impedance and systemic inflammatory response with quality of life and prognosis in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a prospective study. *Nutr Cancer* 64:526–534. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.668744>
391. Palomar Abril V (2021) Valoración de los parámetros inflamatorios como factores de riesgo independiente para supervivencia en los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico localmente avanzado (estadio III) diagnosticados en el Hospital Universitario de Valencia Dr. Peset en
392. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* 454:436–444. <https://doi.org/10.1038/nature07205>

393. Tong YS, Tan J, Zhou XL, et al (2017) Systemic immune-inflammation index predicting chemoradiation resistance and poor outcome in patients with stage III non-small cell lung cancer. *J Transl Med* 15:1–10. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1326-1>
394. Kiriu T, Yamamoto M, Nagano T, et al (2018) The time-series behavior of neutrophil-to-lymphocyte ratio is useful as a predictive marker in non-small cell lung cancer. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193018>
395. Onyema OO, Decoster L, Njemini R, et al (2015) Shifts in subsets of CD8+ T-cells as evidence of immunosenescence in patients with cancers affecting the lungs: An observational case-control study. *BMC Cancer* 15:1–11. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-2013-3>
396. Zhou B, Lawrence T, Liang Y (2021) The Role of Plasmacytoid Dendritic Cells in Cancers. *Front Immunol* 12:1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.749190>
397. Giza HM, Bozzacco L (2021) Unboxing dendritic cells: Tales of multi-faceted biology and function. *Immunology* 164:433–449. <https://doi.org/10.1111/imm.13394>
398. Brody R, Zhang Y, Ballas M, et al (2017) PD-L1 expression in advanced NSCLC: Insights into risk stratification and treatment selection from a systematic literature review. *Lung Cancer* 112:200–215. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.08.005>
399. Schiweck C, Valles-Colomer M, Arolt V, et al (2020)

- Depression and suicidality: A link to premature T helper cell aging and increased Th17 cells. *Brain Behav Immun* 87:603–609. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.02.005>
400. Miyata S, Ishino Y, Shimizu S, Tohyama M (2022) Involvement of inflammatory responses in the brain to the onset of major depressive disorder due to stress exposure. *Front Aging Neurosci* 14:.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.934346>
401. Rybka J, Kędziora-Kornatowska K, Kędziora J, Kucharski R (2009) Immunosenescence and late life depression. *Cent J Immunol* 34:271–275
402. Elwenspoek MMC, Kuehn A, Muller CP, Turner JD (2017) The effects of early life adversity on the immune system. *Psychoneuroendocrinology* 82:140–154.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.05.012>
403. Elwenspoek MMC, Sias K, Hengesch X, et al (2017) T cell immunosenescence after early life adversity: Association with cytomegalovirus infection. *Front Immunol* 8:1–12.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01263>
404. Klopack ET, Crimmins EM, Cole SW, et al (2022) Social stressors associated with age-related T lymphocyte percentages in older US adults: Evidence from the US Health and Retirement Study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119:1–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.2202780119>
405. Fu J, Duan J, Mo J, et al (2021) Mild Cognitive

- Impairment Patients Have Higher Regulatory T-Cell Proportions Compared With Alzheimer's Disease-Related Dementia Patients. *Front Aging Neurosci* 12:1–7. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.624304>
406. Serre-Miranda C, Roque S, Santos NC, et al (2015) Effector memory CD4+ T cells are associated with cognitive performance in a senior population. *Neurol Neuroimmunol NeuroInflammation* 2:. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000054>
407. Luz Correa B, Ornaghi AP, Cerutti Muller G, et al (2014) The inverted CD4:CD8 ratio is associated with cytomegalovirus, poor cognitive and functional states in older adults. *Neuroimmunomodulation* 21:206–212. <https://doi.org/10.1159/000356827>
408. Moro-García MA, Alonso-Arias R, López-Vázquez A, et al (2012) Relationship between functional ability in older people, immune system status, and intensity of response to CMV. *Age (Omaha)* 34:479–495. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9240-6>
409. Johnstone J, Parsons R, Botelho F, et al (2017) T-Cell Phenotypes Predictive of Frailty and Mortality in Elderly Nursing Home Residents. *J Am Geriatr Soc* 65:153–159. <https://doi.org/10.1111/jgs.14507>
410. Sergi G, De Rui M, Sarti S, Manzato E (2011) Polypharmacy in the elderly: Can comprehensive geriatric assessment reduce inappropriate medication use? *Drugs and Aging* 28:509–518.

<https://doi.org/10.2165/11592010-000000000-00000>

411. Guthrie B, Makubate B, Hernandez-Santiago V, Dreischulte T (2015) The rising tide of polypharmacy and drug-drug interactions: Population database analysis 1995-2010. *BMC Med* 13:1–10.
<https://doi.org/10.1186/s12916-015-0322-7>
412. Semmarath W, Seesen M, Yodkeeree S, et al (2019) The association between frailty indicators and blood-based biomarkers in early-old community dwellers of Thailand. *Int J Environ Res Public Health* 16:.
<https://doi.org/10.3390/ijerph16183457>
413. Collerton J, Martin-Ruiz C, Davies K, et al (2012) Frailty and the role of inflammation, immunosenescence and cellular ageing in the very old: Cross-sectional findings from the Newcastle 85+ Study. *Mech Ageing Dev* 133:456–466. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2012.05.005>
414. Marcos-Pérez D, Sánchez-Flores M, Maseda A, et al (2018) Frailty in older adults is associated with plasma concentrations of inflammatory mediators but not with lymphocyte subpopulations. *Front Immunol* 9:1–9.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01056>
415. Smith SH (2017) Using albumin and prealbumin to assess nutritional status. *Nursing (Lond)* 47:65–66.
<https://doi.org/10.1097/01.NURSE.0000511805.83334.df>
416. Rihacek M, Bienertova-Vasku J, Valik D, et al (2015) B-Cell Activating Factor as a Cancer Biomarker and Its

Implications in Cancer-Related Cachexia. *Biomed Res Int* 2015;. <https://doi.org/10.1155/2015/792187>

417. Baazim H, Antonio-Herrera L, Bergthaler A (2022) The interplay of immunology and cachexia in infection and cancer. *Nat Rev Immunol* 22:309–321. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00624-w>
418. Narsale A, Moya R, Ma J, et al (2019) Cancer-driven changes link T cell frequency to muscle strength in people with cancer: a pilot study. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 10:827–843. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12424>
419. Baazim H, Schweiger M, Moschinger M, et al (2019) CD8+ T cells induce cachexia during chronic viral infection. *Nat Immunol* 20:701–710. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0397-y>
420. Nilsson B, Wikby A, Johansson B, et al (2002) Expansions of peripheral blood CD8 T-lymphocyte subpopulations and an association with cytomegalovirus seropositivity in the elderly : the Swedish NONA immune study. *Exp Gerontol* 37:445–453.
421. Bauer ME, Fuente MD la (2016) The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence. *Mech Ageing Dev* 158:27–37. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2016.01.001>
422. Savoy SKA, Boudreau JE (2019) The evolutionary arms race between virus and NK cells: Diversity enables population-level virus control. *Viruses* 11:

<https://doi.org/10.3390/v111100959>

423. Nikolich-Žugich J, Čicin-Šain L, Collins-McMillen D, et al (2020) Advances in cytomegalovirus (CMV) biology and its relationship to health, diseases, and aging. *GeroScience* 42:495–504.
<https://doi.org/10.1007/s11357-020-00170-8>
424. Van Herck Y, Feyaerts A, Alibhai S, et al (2021) Is cancer biology different in older patients? *Lancet Heal Longev* 2:e663–e677. [https://doi.org/10.1016/S2666-7568\(21\)00179-3](https://doi.org/10.1016/S2666-7568(21)00179-3)
425. Wu Z, Zheng Y, Sheng J, et al (2022) CD3+CD4-CD8- (Double-Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer. *Front Immunol* 13:1–14.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.816005>
426. Overgaard NH, Jung J-W, Steptoe RJ, Wells JW (2015) CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J Leukoc Biol* 97:31–38.
<https://doi.org/10.1189/JLB.1RU0814-382>

TABLAS Y FIGURAS

9. Lista de tablas y de figuras

9.1. Lista de tablas

Tabla 1. Resultados de la valoración geriátrica integral, en los pacientes ≥ 70 años ($n = 59$).

Tabla 2. Estadísticos descriptivos para las variables bioquímicas nutricionales e inflamatorias.

Tabla 3. Estadísticos descriptivos para los parámetros básicos del hemograma.

Tabla 4. Estadísticos descriptivos para las poblaciones linfocitarias básicas.

Tabla 5. Punto de corte óptimo para la edad en diferentes poblaciones celulares.

Tabla 6. Porcentajes de edad categorizada en cada "cluster" (jóvenes < 70 años; ancianos ≥ 70 años).

Tabla 7. Porcentajes de los grupos de edad y ECOG en cada "cluster" (grupo 1: pacientes jóvenes con ECOG 0-1; grupo 2: pacientes ancianos con ECOG 0-1; grupo 3: pacientes jóvenes con ECOG 2-4 y grupo 4: pacientes ancianos con ECOG 2-4).

Tabla 8. Porcentajes de pacientes categorizada en cada "cluster" según la valoración del test MNA (normal > 11 puntos; alterado ≤ 11 puntos).

Tabla 9. Frecuencia de pacientes ancianos en cada "cluster".

Tabla 10. Porcentajes de pacientes categorizada en cada "cluster" según la situación nutricional en el grupo de pacientes ancianos. p-valor del test exacto de Fisher: 0.131.

Tabla 11. Porcentajes de pacientes categorizada en cada "cluster" según la valoración del test MNA en el grupo de pacientes ancianos (normal >11 puntos; alterado \leq 11 puntos). p-valor del test exacto de Fisher: 0.082.

Tabla 12. Porcentajes de pacientes categorizada en cada "cluster" según la valoración del test SPPB categorizado en el grupo de pacientes ancianos (sin limitación \geq 10 puntos; limitación leve 7-9 puntos; moderada, 4-6 puntos; severa \leq 3 puntos). p-valor del test exacto de Fisher: 0.182.

Tabla 13. Porcentajes de pacientes categorizada en cada "cluster" según la clasificación geriátrica de Balducci. p-valor del test exacto de Fisher: 0.308.

Tabla 14. Porcentajes de pacientes categorizada en cada "cluster" según la clasificación geriátrica de SIOG1. P-valor del test exacto de Fisher: 0.823.

9.2. Lista de figuras

Figura 1. Principales moléculas en la sinapsis inmunológica entre CPA y linfocitos T.

Figura 2. Principales cambios tisulares en el envejecimiento.

Figura 3. Determinantes del envejecimiento. Adaptado de López-Otín y otros [171].

Figura 4. Representación de los marcadores de membrana de los diferentes subtipos de linfocitos T según su estadio madurativo.

Figura 5. Representación de la actividad del sistema inmune exhausto contra una célula tumoral, en la que predominan las señales inhibitorias.

Figura 6. Papel del sistema inmunológico en el desarrollo inicial del cáncer.

Figura 7. Determinantes del cáncer. Cedido por Vicente Palomar-Abril Adaptado de Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell [Internet]. 2011;144(5):646–74.

Figura 8. Pirámide de población (mostrando sexos y rango de edad) correspondiente al Departamento de Salud de Valencia Doctor Peset. Extraída de la web del departamento [252].

Figura 9. Diagrama de flujo de pacientes del estudio.

Figura 10. Citómetro de flujo empleado en el proyecto, modelo CytoFLEX de Beckman Coulter® (imagen extraída de la página web de Beckman Coulter) [272]. Aspecto externo (arriba) y componentes principales (abajo).

Figura 11. Representación esquemática de los elementos principales para el estudio de muestras mediante citometría de flujo (elementos fluidicos, ópticos y detectores).

Figura 12. Gráficos de puntos definidos por dos variables (en eje X e Y) para el análisis de linfocitos T. Se han coloreado los linfocitos CD8⁺ en azul y CD4⁺ en rojo.

Figura 13-A. Protocolo de análisis para la distribución de los linfocitos T facilitado por Beckman Coulter® (en blanco y negro).

Figura 13-B. Protocolo definitivo del estudio para el análisis de la distribución de los linfocitos T (imágenes en color).

Figura 14-A. Protocolo de análisis para la distribución del TCR facilitado por Beckman Coulter® (en blanco y negro).

Figura 14-B. Protocolo de definitivo del estudio para el análisis de la distribución del TCR (en color).

Figura 15-A. Protocolo de análisis para los linfocitos T reguladores facilitado por Beckman Coulter® (en blanco y negro).

Figura 15-B. Protocolo inicial del estudio para el análisis de los linfocitos T reguladores (en color).

Figura 15-C. Protocolo definitivo de análisis para los linfocitos T reguladores (en color).

Figura 16-A. Protocolo de análisis para la distribución de las células dendríticas facilitado por Beckman Coulter® (en blanco y negro).

Figura 16-B. Protocolo definitivo del estudio de análisis para la distribución de las células dendríticas (en color).

Figura 17. Histograma de frecuencias de la variable edad.

Figura 18. Diagrama de sectores con la variable ECOG.

Figura 19. Diagramas de cajas y bigotes que muestran el % de pérdida de peso en pacientes jóvenes y ancianos (arriba) y en los grupos que incluyen la edad y ECOG (abajo). Leyenda: 1 = jóvenes con ECOG 0-1; 2 = ancianos con ECOG 0-1; 3 = jóvenes con ECOG 2-4; 4 =

ancianos con ECOG 2-4. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

Figura 20-A. Diagrama de barras con la distribución de la variable MNA (mini nutritional assessment) en pacientes jóvenes y ancianos.

Figura 20-B. Diagrama de sectores con la situación nutricional de los pacientes: normal, precaquexia o caquexia.

Figura 21. Diagrama de barras con la distribución de las variables diabetes, cardiopatía isquémica (Cardiop) y enfermedades neurodegenerativas (Enf_neurod).

Figura 22. Diagramas de cajas y bigotes que muestran la edad de los pacientes en función de las variables diabetes (arriba), cardiopatía isquémica (centro) y enfermedades neurodegenerativas (abajo). Leyenda: 0 = no; 1 = sí. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

Figura 23. Diagramas de barras con la distribución del nivel de estudios en pacientes jóvenes y ancianos. Leyenda: 1 = elemental; 2 = bachillerato; 3 = universitario; resto no adquiridos).

Figura 24. Diagramas de barras con la distribución de pacientes en función de su estado civil (arriba) y composición del hogar (abajo). Leyenda (izquierda): 1 = soltero/a; 2 = casado/a; 3 = separado/a; 4 = viudo/a; resto no adquiridos. Leyenda (derecha): 1 = vive solo/a; 2 = vive acompañado/a; resto no adquiridos).

Figura 25. Diagramas de cajas y bigotes que muestran la mediana y rangos de la escala de valoración social MOSs en el subgrupo de pacientes jóvenes y ancianos. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

Figura 26. Diagramas de barras con la distribución de las variables ansiedad (arriba) y depresión (abajo) en pacientes jóvenes y

ancianos. Leyenda: [0,7] = no indica caso; (7,10] = caso probable; (10,17] = caso confirmado.

Figura 27. Arriba (izquierda): diagrama de sectores con la clasificación G8. Leyenda: [5,14] = anormal; (14,17] = normal; resto no adquirido. Arriba (derecha): diagrama de sectores con la capacidad auditiva. Leyenda: 1 = conservada; 2 = alterada. Abajo: diagrama de barras con el número de caídas en los 6 meses previos al diagnóstico de CPNM.

Figura 28. Izquierda: diagrama de barras con la puntuación de los pacientes ancianos según la escala Barthel. Derecha: diagrama de sectores con la clasificación de la escala Barthel en: independiente, dependencia leve, moderada o grave. Blanco: valores no adquiridos.

Figura 29. Diagramas de sectores con la clasificación en función de la escala de Pfeiffer (izquierda) y mini-mental (derecha).

Figura 30 (izquierda). Diagramas de sectores con la clasificación en función de la escala social de Gijón.

Figura 31 (derecha). Diagramas de sectores con la clasificación en función de la escala de depresión de Yesavage.

Figura 32. Diagramas de sectores con la clasificación de los pacientes en función de la escala de Balducci (izquierda; leyenda: 1 = "fit"; 2 = vulnerable; 3 = frágil) y SIOG (derecha; leyenda: 1 = "fit"; 2 = vulnerable; 3 = frágil; 4 = muy frágil; resto no adquirido).

Figura 33. Diagrama de sectores con la clasificación de la histología (arriba) y diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de edad de los pacientes en función de la histología (abajo). A la derecha, en el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

Figura 34. Diagrama de sectores con la clasificación por estadio tumoral (izquierda) y diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de edad de los pacientes en función de la misma variable

(derecha). A la derecha, en el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

Figura 35. Diagrama de sectores con distribución de la expresión de PD-L1.

Figura 36. Gráfico que muestra la V de Cramer (0-1) para determinar la correlación entre variables clínicas categóricas.

Figura 37. Matriz que muestra la correlación mediante el test de Kruskal Wallis ($1 - p$ valor mediante este test) entre las variables categóricas clínicas y las principales variables numéricas.

Figuras 38. Diagramas de cajas y bigotes con la mediana y rangos del porcentaje de pérdida de peso (izquierda) y del valor de la escala de MNA (derecha) en función del ECOG.

Figura 39. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de la valoración de MNA en función del resultado la escala de depresión.

Figura 40-A. Diagramas de cajas y bigotes con la mediana y rangos de los niveles de albúmina (arriba izquierda), PCR (arriba derecha) y neutrófilos (izquierda) en función de la escala ECOG.

Figura 40-B. Diagramas de cajas y bigotes con la mediana y rangos del porcentaje de pérdida de peso (izquierda), y puntuación en la escala MNA (derecha) en función de la escala ECOG.

Figura 41-A. Diagramas de cajas y bigotes con la mediana y rangos los niveles de linfocitos CD4⁺ (arriba), y CD8⁺ (abajo) en función de la escala ECOG. En el título de algunos gráficos se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

Figura 41-B. Diagramas de cajas y bigotes con la mediana y rangos del número de linfocitos gamma-delta VD2⁺ en función del ECOG. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

Figura 42-A. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de los niveles de IL-6 en función de la clasificación nutricional. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

Figura 42-B. Diagramas de cajas y bigotes con la mediana y rangos de los niveles de linfocitos B (arriba izquierda), linfocitos CD8⁺ (arriba derecha) y CD4⁺ maduros (abajo izquierda) en función de la clasificación nutricional. Abajo derecha se muestra la mediana y rango de linfocitos CD4⁺ EM en pacientes jóvenes. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

Figura 43-A. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rango del nivel de neutrófilos en función del estadio.

Figura 43-B. Diagramas de cajas y bigotes con la mediana y rango del nivel de células dendríticas mieloides (izquierda) y plasmocitoides (derecha) en función del estadio. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

Figura 44-A. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos del porcentaje de expresión de PD-L1 en el tumor en función de la histología.

Figura 44-B. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de los niveles de células CD8⁺ inmaduras en sangre periférica en función de la histología.

Figura 45-A. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de albúmina (arriba) y PCR (abajo) en función de la valoración por la escala de Lawton. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

Figura 45-B. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de la ratio CD4⁺/CD8⁺ (arriba izquierda), niveles de linfocitos T reguladores (arriba derecha) y linfocitos $\gamma\delta$ V δ 1-V δ 2⁺ (abajo) en función

de la valoración por la escala de Lawton. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

Figura 45-C. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de linfocitos CD8⁺ exhaustos en función de la escala de depresión (arriba) y de linfocitos CD8⁺ maduros en función de la valoración por la escala social de Gijón (abajo). En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

Figura 45-D. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de linfocitos CD8⁺ centrales de memoria (izquierda) y de linfocitos CD4⁺ reguladores (derecha) en función de la valoración por la escala Pfeiffer. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

Figura 45-E. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de linfocitos CD8⁺ exhaustos (izquierda) y de linfocitos CD4⁺ efectores de memoria (derecha) en función de la presencia de polifarmacia. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

Figura 45-F. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de linfocitos CD4⁺ reguladores (arriba), IL-6 (abajo izquierda) y PCR (abajo derecha) en función de la valoración por la escala SPPB. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

Figura 45-G. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de linfocitos $\gamma\delta$ V δ 2⁺V δ 1⁻ en función de la valoración por la escala SIOG1. En el título del gráfico se incluye el p-valor del test Kruskal-Wallis.

Figura 46. Gráfico que muestra la correlación de Spearman (coeficiente expresado en porcentaje) entre las variables analíticas y la edad.

Figura 47. Diagramas de dispersión que muestran la correlación de Spearman entre el recuento de linfocitos B (izquierda), el porcentaje de linfocitos B (centro) y el porcentaje de linfocitos NK (derecha)

inmaduros y la edad. En el título del gráfico se incluye el coeficiente y p-valor del test Rho de Spearman.

Figura 48-A. Gráfico que muestra la correlación de Spearman entre los valores absolutos de las poblaciones linfocitarias específicas y la edad.

Figura 48-B. Gráfico que muestra la correlación de Spearman entre los porcentajes de las poblaciones linfocitarias específicas y la edad.

Figura 49-A. Diagramas de dispersión que muestran el estudio de la correlación mediante el test de Spearman entre linfocitos CD8⁺ inmaduros y la edad. En el título del gráfico se incluye el coeficiente y p-valor del test Rho de Spearman.

Figura 49-B. Diagramas de dispersión que muestran el estudio de la correlación mediante el test de Spearman entre linfocitos CD4⁺ inmaduros y la edad. En el título del gráfico se incluye el coeficiente y p-valor del test Rho de Spearman.

Figura 50-A. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de linfocitos CD4⁺ EM (arriba) y TEMRA (abajo) en función de la presencia de IgG de CMV (estadísticamente significativo mediante el test Kruskal-Wallis).

Figura 50-B. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de linfocitos CD8⁺ efectores terminales (arriba izquierda), TEMRA (arriba derecha) y ratio CD4⁺/CD8⁺ (izquierda) en función de la presencia de IgG de CMV (estadísticamente significativo mediante el test Kruskal-Wallis).

Figura 50-C. Diagrama de cajas y bigotes con la mediana y rangos de linfocitos NK (izquierda) y $\gamma\delta$ V δ 2-V δ 1⁺ (derecha) en función de la presencia de IgG de CMV (estadísticamente significativo mediante el test Kruskal-Wallis).

Figura 51. Gráfico PCA para la muestra global. Las barras y puntos muestran el porcentaje de varianza explicada por cada componente principal.

Figura 52. Gráfico de contribución de cada variable al valor anómalo del paciente 163 en su distancia al modelo PCA.

Figura 53-A. Modelo de análisis de componentes principales con las variables representadas mediante vectores en función de su contribución a las dos primeras componentes en el grupo global.

Figura 53-B. Modelo de análisis de componentes principales con las variables representadas mediante vectores en función de su contribución a 3ª y 4ª componentes en el grupo global.

Figura 54. Gráfico que muestra la correlación de Pearson entre las variables linfocitarias más relevantes en el modelo PCA para los componentes Dim1 y Dim2.

Figura 55. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes coloreados en función de la variable edad categorizada + ECOG, para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 – Dim4 (derecha). Leyenda: grupo I = ECOG 0-1 + edad <70 años; grupo II = ECOG 0-1 + edad ≥70 años; grupo III = ECOG 3-4 + edad <70 años; grupo IV = ECOG 3-4 + edad ≥70 años.

Figura 56-A. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes coloreados en función de la variable situación nutricional (alterado o normal), para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 y Dim4 (derecha).

Figura 56-B. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes coloreados en función de la variable MNA (alterado o normal), para los componentes Dim1 y Dim2.

Figura 57-A. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes coloreados en función de la variable estadio, para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 – Dim4 (derecha).

Figura 57-B. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes coloreados en función de la variable expresión de PD-L1, para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 – Dim4 (derecha).

Figura 58. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes coloreados en función de la variable presencia de anticuerpos IgG contra CMV, para los componentes Dim1 y Dim2. Leyenda: 0 = no; 1 = sí.

Figura 59. Gráfico PCA para la población anciana. Las barras y puntos muestran el porcentaje de varianza explicada por cada componente principal.

Figura 59. Gráfico PCA para la población anciana. Las barras y puntos muestran el porcentaje de varianza explicada por cada componente principal.

Figura 60-A. Modelo de análisis de componentes principales con las variables representadas mediante vectores en función de su contribución a las dos primeras componentes principales en el grupo de pacientes ancianos.

Figura 60-B. Modelo de análisis de componentes principales con las variables representadas mediante vectores en función de su contribución a la 3ª y 4ª componentes principales en el grupo de pacientes ancianos.

Figura 61. Gráfico que muestra la correlación de Pearson entre las variables linfocitarias más relevantes en el modelo PCA en los pacientes ancianos para los componentes Dim1 y Dim2 (arriba) y Dim3 y Dim4 (izquierda).

Figura 62. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes ancianos coloreados en función de la clasificación mediante el test de Barthel, para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 y Dim4 (derecha).

Figura 63. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes ancianos coloreados en función de la clasificación mediante el test de Lawton-Brody, para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 y Dim4 (derecha).

Figura 64-A. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes ancianos coloreados en función de la clasificación del test de Pfeiffer, para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 y Dim4 (derecha).

Figura 64-B. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes ancianos coloreados en función de la clasificación del mini-mental test de Lobo, para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 y Dim4 (derecha).

Figura 65. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes ancianos coloreados en función de la clasificación del cuestionario de Gijón, para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 y Dim4 (derecha).

Figura 66. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes ancianos coloreados en función de la presencia o no de caídas en los últimos 6 meses, para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 y Dim4 (derecha). Leyenda: Yes = sí; No = no.

Figura 67. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes ancianos coloreados en función de clasificación geriátrica SIOG1, para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 y Dim4 (derecha). Leyenda: 1 = "fit"; 2 = vulnerable; 3 = frágil; 4 = "muy frágil".

Figura 68. Gráfico PCA para los casos en los que se estudiaron las subpoblaciones de linfocitos CD4⁺ T reguladores. Las barras y puntos muestran el porcentaje de varianza explicada por cada componente principal.

Figura 69. Modelo de análisis de componentes principales con las variables representadas mediante vectores en función de su contribución a las dos primeras componentes principales (izquierda) y a la 3^a y 4^a componentes principales (derecha) en el grupo de pacientes en los que se estudiaron las subpoblaciones de linfocitos CD4⁺ T reguladores.

Figura 70. Gráfico de scores del análisis de PCA con los pacientes coloreados en función de la presencia de anticuerpos IgG contra CMV, para los componentes Dim1 y Dim2. Leyenda: 0 = no; 1 = sí.

Figura 71. Representación mediante gráficos de puntos del valor de p para la diferencia de media/mediana del recuento linfocitario de distintas subpoblaciones para los dos grupos de individuos (jóvenes-ancianos) creados con cada punto de edad, obtenido mediante el test t-Student (rojo) y test de Wilcoxon (azul).

Figura 72. Diagrama de puntos con la representación de las medianas y rangos para los valores de cada población linfocitaria del "cluster" 0.

Figura 73. Diagrama de puntos con la representación de las medianas y rangos para los valores de cada población linfocitaria del "cluster" 1.

Figura 74. Diagrama de puntos con la representación de las medianas y rangos para los valores de cada población linfocitaria del "cluster" 2.

Figura 75. Diagrama de puntos con la representación de las medianas y rangos para los valores de cada población linfocitaria del "cluster" 3.

Figura 76. Diagrama de puntos con la representación de las medianas y rangos para los valores de cada población linfocitaria del "cluster" 4.

Figura 77. Diagrama de puntos con la representación de las medianas y rangos para los valores de cada población linfocitaria del “cluster” 5.

Figura 78. Diagrama de puntos con la representación de las medianas y rangos para los valores de cada población linfocitaria del “cluster” 6.

Figura 79. Diagrama de puntos con la representación de las medianas y rangos para los valores de cada población linfocitaria del “cluster” 7.

Figura 80. Diagrama de puntos con la representación de las medianas y rangos para los valores de cada población linfocitaria del “cluster” 8.

Figura 81. Diagramas de cajas y bigotes para cada “cluster” en las variables ECOG (arriba) y porcentaje de pérdida de peso (abajo).

Figura 82. Diagramas de cajas y bigotes para cada “cluster” en las variables albúmina (página anterior), PCR (página anterior) e IL-6 (página actual).

Figura 83. Gráfico de scores del análisis de componentes principales con los pacientes ancianos coloreados en función de clasificación por “clusters”, para los componentes Dim1 y Dim2 (izquierda) y Dim3 y Dim4 (derecha).

Figura 84. Diagramas de cajas y bigotes para cada “cluster” en función de la puntuación con el test MNA en el grupo de pacientes ancianos.

Figura 85. Diagramas de cajas y bigotes para cada “cluster” en función de la puntuación con el test G8 en el grupo de pacientes ancianos.

Figura 86. Diagramas de cajas y bigotes para cada “cluster” en función de la puntuación de la escala social de Gijón en el grupo de pacientes ancianos.

Figura 87. Diagramas de cajas y bigotes para cada “cluster” en función de la puntuación con el test de depresión (arriba) y el test de Yesavage (abajo) en el grupo de pacientes ancianos.

Figura 88. Diagramas de cajas y bigotes para cada "cluster" en función del número de fármacos prescritos en grupo de pacientes ancianos.

ANEXOS

10. Anexos

10.1. Resolución del comité ético de investigación clínica (CEIC) del Hospital Universitario Doctor Peset



A/A.: **Dra. Teresa Soria**
Servicio de Oncología

Dña. Pilar Codoñer Franch, Presidenta del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Dr. Peset.

CERTIFICA:

Que este comité en su reunión celebrada el día 27 de Septiembre de 2017 ha evaluado y ha aprobado el estudio titulado: Valoración de parámetros celulares y bioquímicos como marcadores de inmunosenescencia y su relación con variables clínicas en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico diagnosticados en el Hospital Universitario Doctor Peset.

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.

La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Son adecuados la Hoja de información al paciente, el procedimiento para obtener el consentimiento informado, y el modo de reclutamiento previsto.

Se cumplen los preceptos éticos formulados en la Declaración de Helsinki de la

Asociación Médica Mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa aplicable en función de las características del estudio

Proyecto de investigación. Tesis doctoral

Código Ceic: 79/17

Valencia 29 de Septiembre de 2017

Fdo.: Dra. Pilar Codoñer Franch



10.2. Hoja de información a los pacientes y consentimiento informado

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Título	<i>Valoración de parámetros celulares y bioquímicos como marcadores de inmunosenescencia y su relación con variables clínicas en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico diagnosticados en el Hospital Universitario Doctor Peset</i>
Investigador principal	Teresa Soria Comes
Centro	HOSPITAL UNIVERSITARIO DR. PESET DE VALENCIA
Teléfono de contacto	Oncología Médica - 961622582

1. INTRODUCCIÓN

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un *estudio de investigación* en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la del Hospital Universitari Dr. Peset de València, de acuerdo a la legislación vigente y las normas de buena práctica clínica.

Nuestra intención es que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda decidir si acepta o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir. Además puede consultar con las personas que considere oportuno.

2. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir NO participar. Si decide participar, puede cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su atención sanitaria.

3. OBJETIVO DEL ESTUDIO

El objetivo de este proyecto de investigación es el estudio del sistema inmunitario de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado y su relación con parámetros clínicos (estado funcional, nutrición, edad...).

4. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

Se propone su inclusión en un estudio de investigación titulado: *“Valoración de parámetros celulares y bioquímicos como marcadores de inmunosenescencia y su relación con variables clínicas en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico diagnosticados en el Hospital Universitario Doctor Peset”*.

Se pretenden incluir 182 pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón no microcítico, mayores de 18 años y analizar si existen diferencias en cuanto su sistema inmunológico en función de la edad y otros factores como la situación funcional, nutricional, emocional... Esto se hará exclusivamente al momento del diagnóstico, independientemente del tratamiento que se planifique para usted.

5. ACTIVIDADES DEL ESTUDIO

Además de todas las exploraciones que se realizan como parte del diagnóstico habitual de la neoplasia de pulmón se realizará:

- Aprovechando la extracción analítica al diagnóstico: estudio de parámetros nutricionales e inmunológicos (hemograma y subpoblaciones de linfocitos) y serología de virus hepatotropos en los casos indicados.
- Se le remitirá al servicio de Alergología para el estudio del aire exhalado. La técnica consiste en realizar respiraciones dentro de un tubo condensador durante 10 minutos. Esta muestra se obtendrá a baja temperatura y posteriormente se analizará.

6. RIESGOS Y MOLESTIAS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN

En este estudio no se va a modificar el tratamiento que se ha decidido administrarle. Sólo se utilizarán los datos de su historia clínica, de sus pruebas diagnósticas y de muestras de sangre.

Además, no se va a realizar ninguna intervención adicional como consecuencia de la participación del estudio.

7. POSIBLES BENEFICIOS

Todos los datos obtenidos serán empleados con fines exclusivamente de investigación. Con este estudio se pretende tener un conocimiento más amplio de las características de la población diagnosticada de cáncer de pulmón.

8. CONFIDENCIALIDAD

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales

De acuerdo a lo que establece la legislación de protección de datos, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Además de los derechos anteriormente citados, y en aplicación del Reglamento (UE) 2016/679 de Parlamento europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos, ahora también puede limitar el tratamiento de datos que sean incorrectos solicitar una copia o que se trasladen a un tercero (portabilidad) los datos que usted ha facilitado para el estudio.

Si deja de participar en el estudio, los datos obtenidos no se pueden eliminar para así garantizar la validez de la investigación. Así mismo, tiene derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no quedara satisfecho.

Tanto el Centro, como los investigadores, son responsables respectivamente del tratamiento de sus datos y se comprometen a cumplir con la normativa de protección de datos en vigor. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código, de manera que no se incluya información que pueda identificarle, y sólo su médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a ninguna otra persona salvo a las autoridades sanitarias, cuando así lo requieran o en casos de urgencia médica. Los Comités de Ética de la Investigación y los representantes de la Autoridad Sanitaria en materia de inspección, únicamente podrán acceder para comprobar los datos personales, los procedimientos del estudio clínico y el cumplimiento de las normas de buena práctica clínica (siempre manteniendo la confidencialidad de la información).

El Investigador e Investigadores colaboradores están obligados a conservar los datos recogidos para el estudio al menos hasta 25 años tras su finalización. Posteriormente, su información personal solo se conservará por el centro para el cuidado de su salud para otros fines de investigación científica si usted hubiera otorgado su consentimiento para ello, y si así lo permite la ley y requisitos éticos aplicables.

Si realizáramos transferencia de sus datos codificados fuera de la Unión Europea, los datos del participante quedarán protegidos con salvaguardas tales como contratos u otros mecanismos por las autoridades de protección de datos.

9. OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

10. DATOS DE CONTACTO

Si durante su participación tiene alguna duda o necesita obtener más información, póngase en contacto con el teléfono facilitado de Oncología Médica (961622582).

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título	<i>Valoración de parámetros celulares y bioquímicos como marcadores de inmunosenescencia y su relación con variables clínicas en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico diagnosticados en el Hospital Universitario Doctor Peset</i>
---------------	---

Yo, _____

- He leído la hoja de información que se me ha entregado sobre el estudio.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.
- He hablado con _____
- 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.

Recibiré una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento informado.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio. Firma del participante.

Firma y nombre del participante
Fecha: ___/___/___

Firma y nombre del investigador
Fecha: ___/___/___

* Cuando se obtenga el CI en personas con capacidad modificada para dar su CI.

Firma del representante
legal, familiar o persona
vinculada de hecho
Fecha: ___/___/___

Firma del investigador

Fecha: ___/___/___

10.3. Escalas de valoración funcional en el paciente joven

1.- SITUACIÓN NUTRICIONAL

Peso (kg)	
Talla (m)	
IMC	
Pérdida de peso los últimos 6 meses (%)	

Mini-nutritional assessment (MNA)

Ha perdido el apetito? Ha comido menos por falta de apetito, problemas digestivos, dificultades de masticación o deglución en los últimos 3 meses?	0 = ha comido mucho menos 1 = ha comido menos 2 = ha comido igual
Pérdida reciente de peso (<3 meses)	0 = pérdida de peso > 3 kg 1 = no lo sabe 2 = pérdida de peso entre 1 y 3 kg 3 = no ha habido pérdida de peso
Movilidad	0 = de la cama al sillón 1 = autonomía en el interior 2 = sale del domicilio
Ha tenido una enfermedad aguda o situación de estrés psicológico en los últimos 3 meses?	0 = sí 2 = no

Problemas neuropsicológicos	0 = demencia o depresión grave 1 = demencia moderada 2 = sin problemas psicológicos
Índice de masa corporal (IMC) = peso en kg / (talla en m)²	0 = IMC <19 1 = 19 ≤ IMC < 21 2 = 21 ≤ IMC < 23 3 = IMC ≥ 23

2.- PARÁMETROS DEMOGRÁFICOS Y SITUACIÓN SOCIAL

Nivel de estudios

Elemental	Bachillerato	Universitario
-----------	--------------	---------------

Estado civil

Soltero/a	Casado/a	Separado/a	Viudo/a
-----------	----------	------------	---------

Composición del hogar

Vive solo/a	Acompañado/a
-------------	--------------

Escala de valoración del apoyo social (MOS simplificada)

	Nunca	Pocas veces	Ni mucho ni poco	Casi siempre	Siempre
Alguien en quien confiar o hablar de sus problemas	1	2	3	4	5
Alguien con quien relajarse	1	2	3	4	5
Alguien que le ayude en sus tareas diarias	1	2	3	4	5
Alguien que le aconseje cómo resolver sus problemas	1	2	3	4	5
Alguien a quien amar y sentirse querido	1	2	3	4	5

3.- SITUACIÓN EMOCIONAL

Escala de ansiedad-depresión

<p>A1. Me siento tenso/a o nervioso/a: 3. Casi todo el tiempo 2. Gran parte del día 1. De vez en cuando. 0. Nunca</p>	<p>D1. Sigo disfrutando de las cosas como siempre: 0. Ciertamente, igual que antes. 1. No tanto como antes. 2. Solamente un poco. 3. Ya no disfruto con nada</p>
<p>A2. Siento una especie de temor como si algo malo fuera a suceder: 3. Sí, y muy intenso. 2. Sí, pero no muy intenso. 1. Sí, pero no me preocupa. 0. No siento nada de eso.</p>	<p>D2. Soy capaz de reírme y ver el lado gracioso de las cosas: 0. Igual que siempre. 1. Actualmente algo menos. 2. Actualmente mucho menos 3. Actualmente en absoluto</p>
<p>A3. Tengo la cabeza llena de preocupaciones: 3. Casi todo el día. 2. Gran parte del día. 1. De vez en cuando. 0. Nunca.</p>	<p>D3. Me siento alegre: 3. Nunca 2. Muy pocas veces. 1. En algunas ocasiones. 0. Gran parte del día</p>
<p>A4. Soy capaz de permanecer sentado/a tranquilo/a y relajado/a: 0. Siempre 1. A menudo 2. Raras veces. 3. Nunca.</p>	<p>D4. Me siento lento/a y torpe: 3. Gran parte del día. 2. A menudo. 1. A veces. 0. Nunca</p>
<p>A5. Experimento una desagradable sensación de nervios y hormigueos en el estómago: 0. Nunca 1. Sólo en algunas ocasiones. 2. A menudo. 3. Muy a menudo.</p>	<p>D5. He perdido el interés por mi aspecto personal: 3. Completamente. 2. No me cuido como debería hacerlo. 1. Es posible que no me cuido como debiera. 0. Me cuido como siempre.</p>
<p>A6. Me siento inquieto/a como si no pudiera parar de moverme: 3. Realmente mucho. 2. Bastante. 1. No mucho. 0. En absoluto.</p>	<p>D6. Espero las cosas con ilusión. 0. Como siempre. 1. Algo menos que antes. 2. Mucho menos que antes. 3. En absoluto.</p>
<p>A7. Experimento de repente sensaciones de gran angustia o terror. 3. Muy a menudo. 2. Con cierta frecuencia. 1. Raramente. 0. Nunca</p>	<p>D7. Soy capaz de disfrutar con un buen libro o con un buen programa de radio o televisión: 0. A menudo. 1. Algunas veces. 2. Pocas veces. 3. Casi nunca.</p>

0-7 no indica caso; 8-10 caso dudoso; > 11: probable caso (ansiedad/depres).

10.4. Escalas de valoración geriátrica integral

1.- SCREENING

G-8

ITEM	PUNTUACIÓN
1.- ¿Ha disminuido la ingesta los últimos 3 meses por disminución de apetito, problemas digestivos, de masticación o de deglución?	0: disminución severa de la ingesta. 1: disminución moderada de la ingesta 2: ingesta normal
2.- Pérdida de peso los últimos 3 meses	0: pérdida > 3 kg. 1: no lo sabe. 2: pérdida de peso de entre 1-3 kg. 3: no ha perdido peso.
3.- Movilidad	0: no puede levantarse de la cama/silla. 1: puede levantarse de la cama/silla pero no sale de casa. 2: sale de casa.
4.- Problemas neuropsicológicos.	0: demencia o depresión severa. 1: demencia o depresión leve. 2: sin problemas neuropsicológicos.
5.- IMC	0: < 19 1: [19 – 21[2: [21 – 23[3: ≥ 23
6.- Toma más de 3 medicamentos al día	0: sí 1: no
7.- En comparación con otras personas de su edad, ¿cómo consideraría su estado de salud?	0: peor. 0.5: no lo sabe. 1: igual. 2: mejor.
8.- Edad	0: > 85 1: 80-85 2: < 80

Punto de corte sugerido:

≤ 14 puntos

> 14 puntos

2.- SITUACIÓN NUTRICIONAL

Peso (kg)	
Talla (m)	
IMC	
Pérdida de peso los últimos 6 meses (%)	

Mini-nutritional assessment (MNA)

Ha perdido el apetito? Ha comido menos por falta de apetito, problemas digestivos, dificultades de masticación o deglución en los últimos 3 meses?	0 = ha comido mucho menos 1 = ha comido menos 2 = ha comido igual
Pérdida reciente de peso (<3 meses)	0 = pérdida de peso > 3 kg 1 = no lo sabe 2 = pérdida de peso entre 1 y 3 kg 3 = no ha habido pérdida de peso
Movilidad	0 = de la cama al sillón 1 = autonomía en el interior 2 = sale del domicilio
Ha tenido una enfermedad aguda o situación de estrés psicológico en los últimos 3 meses?	0 = sí 2 = no
Problemas neuropsicológicos	0 = demencia o depresión grave 1 = demencia moderada 2 = sin problemas psicológicos
Índice de masa corporal (IMC) = peso en kg / (talla en m)²	0 = IMC <19 1 = 19 ≤ IMC < 21 2 = 21 ≤ IMC < 23 3 = IMC ≥ 23

3.- ESTADO FUNCIONAL

Índice de Barthel

Comer

- (10) Independiente. Capaz de usar cualquier instrumento necesario. Come en un tiempo razonable.
- (5) Necesita ayuda para cortar la carne o el pan, extender la mantequilla, etc.
- (0) Dependiente

Lavarse

- (5) Independiente. Capaz de lavarse entero usando la ducha o baño. Entra y sale solo del baño. Puede hacerlo sin estar otra persona presente.
- (0) Dependiente

Vestirse

- (10) Independiente. Capaz de ponerse y quitarse la ropa, atarse los zapatos, abotonarse y colocarse otros complementos que precise sin ayuda.
- (5) Necesita ayuda, pero realiza sólo al menos la mitad de la tarea en un tiempo razonable.
- (0) Dependiente.

Arreglarse

- (5) Independiente. Incluye lavarse la cara y las manos, peinarse, maquillarse, afeitarse y limpiarse los dientes.
- (0) Dependiente.

Deposición (valorar la semana anterior)

- (10) Continente. Ningún episodio de incontinencia. Si necesita enema o supositorio se lo administra el mismo.
- (5) Ocasional. Un episodio de incontinencia. Necesita ayuda para administrarse enema o supositorio.
- (0) Incontinente.

Micción (valorar la semana anterior)

- (10) Continente. Ningún episodio de incontinencia. Si necesita sonda o colector es capaz de atender sólo su cuidado.
- (5) Ocasional. Como máximo un episodio de incontinencia en 24 horas. Necesita ayuda para el cuidado de la sonda o el colector.
- (0) Incontinente.

Usar el retrete

- (10) Independiente. Usa retrete, bacinilla o cuña sin ayudar y sin manchar. Si va al retrete se quita y pone la ropa, se sienta y se levanta sin ayuda, se limpia y tira de la cadena.
- (5) Necesita ayuda pequeña para mantener el equilibrio, quitar y ponerse la ropa, pero se limpia solo.
- (0) Dependiente.

Trasladarse (sillón /cama /sillón)

- (15) Independiente.
- (10) Mínima ayuda física o supervisión verbal.
- (5) Gran ayuda (persona fuerte o entrenada). Es capaz de permanecer sentado sin ayuda.
- (0) Dependiente. Necesita grúa o ayuda de dos personas; no permanece sentado.

Deambular

- (15) Independiente. Camina solo 50 m, puede ayudarse de bastón, muletas o andador sin ruedas. Si utiliza prótesis es capaz de quitársela y ponérsela.
- (10) Necesita ayuda física o supervisión para andar 50 m
- (5) Independiente en silla de ruedas sin ayuda ni supervisión
- (0) Dependiente

Escalones

- (10) Independiente para subir y bajar un piso sin supervisión ni ayuda de otra persona.
- (5) Necesita ayuda física de otra persona o supervisión.
- (0) Dependiente.

Puntuación orientadora del grado de dependencia:

- < 20 = dependencia total; entre 20-40 = dependencia grave; entre 45-55 = dependencia moderada;
- 60 o más = dependencia leve.

Capacidad auditiva conservada

SÍ

NO

Escala de Lawton y Brody

	Mujer	Varón
Capacidad para usar el teléfono		
Utiliza el teléfono por iniciativa propia	1	1
Es capaz de marcar bien algunos números familiares	1	1
Es capaz de contestar al teléfono pero no de marcar	1	1
No utiliza el teléfono	0	0
Hacer compras		
Realiza todas las compras necesarias independientemente	1	1
Realiza independientemente pequeñas compras	0	0
Necesita ir acompañado para realizar cualquier compra	0	0
Totalmente incapaz de comprar	0	0
Preparación de la comida		
Organiza, prepara y sirve las comidas por sí solo adecuadamente	1	1
Prepara adecuadamente las comidas si se le proporciona ingredientes	0	0
Prepara, calienta y sirve las comidas, pero no sigue una dieta adecuada	0	0
Necesita que le preparen y sirvan las comidas	0	0
Cuidado de la casa		
Mantiene la casa solo o con ayuda ocasional (para trabajos pesados)	1	1
Realiza tareas ligeras, como lavar los platos o hacer las camas	1	1
Realiza tareas ligeras, pero no puede mantener un adecuado nivel	1	1
Necesita ayuda en todas las labores de la casa	1	1
No participa en ninguna labor de la casa	0	0
Lavado de la ropa		
Lava por sí solo toda su ropa	1	1
Lava por sí solo pequeñas prendas	1	1
Todo el lavado de ropa debe ser realizado por otro	0	0
Uso de medios de transporte		
Viaja solo en transporte público o conduce su propio coche	1	1
Es capaz de coger un taxi, pero no usa otro medio de transporte	1	1
Viaja en transporte público cuando va acompañado por otra persona	1	0
Utiliza el taxi o el automóvil sólo con ayuda de otros	0	0
No viaja en absoluto	0	0
Responsabilidad respecto a su medicación		
Es capaz de tomar su medicación a la hora y dosis correcta	1	1
Toma su medicación si la dosis es preparada previamente	0	0
No es capaz de administrarse su medicación	0	0
Manejo de sus asuntos económicos		
Se encarga de sus asuntos económicos por sí solo	1	1
Realiza las compras de cada día, pero necesita ayuda en las grandes compras y en los bancos	1	1
Incapaz de manejar dinero	0	0

Se considera anormal en hombres < 5 puntos

Se considera anormal en mujeres < 8 puntos

Número de caídas en los últimos 6 meses

SPPB (SHORT PHYSICAL PERFORMANCE BATTERY)

- 1) **Equilibrio en bipedestación:** para cada prueba se explica al paciente la tarea. Hay que detener el cronómetro si el paciente mueve los pies o se agarra o cuando pasen 10 segundos. Tándem: el talón de un pie justo delante de los dedos del otro pie. Semitándem: el talón de un pie se coloca al lado del primer dedo del otro pie.

Equilibrio corporal					
Pies a cada lado		Tándem		Semitándem	
< 10 seg	0 puntos	< 10 seg	0 puntos	<10 seg	0 puntos
≥ 10 seg	1 punto	3-10 seg	1 punto	≥ 10 seg	1 punto
		≥ 10 seg	2 puntos		

- 2) **Velocidad de la marcha:** se mide el tiempo que tarda en recorrer el paciente una distancia de 4m caminando a su velocidad normal. El paciente puede usar sus ayudas habituales. Se repite 2 veces y se anota la más rápida de ambas.

Velocidad de marcha	
<4.82seg	4 puntos
4.81 – 6.2 seg	3 puntos
6.21– 8.5 seg	2 puntos
≥ 8.52 seg	1 punto
No puede	0 puntos

- 3) **Levantarse de una silla:** el paciente sentado en una silla de respaldo recto, con los brazos cruzados y se le pide que se levante de una vez sin apoyarse. Si lo hace bien se le pide que se levante y se siente 5 veces lo más rápido que pueda. Se cronometra el tiempo desde cuando está sentado la primera vez hasta que está de pie la quinta vez.

Levantarse de una silla	
≤ 11.1 seg	4 puntos
11.2 – 13.6 seg	3 puntos
13.7 – 16.6 seg	2 puntos
≥ 16.7 seg	1 punto
No puede	0 puntos

4.- EVALUACIÓN COGNITIVA

Pfeiffer

Ítems	ERRORES
¿Qué día es hoy? -día, mes, año-	
¿Qué día de la semana es hoy?	
¿Dónde estamos ahora?	
¿Cuál es su nº de teléfono?	
¿Cuál es su dirección? -preguntar sólo si el paciente no tiene teléfono-	
¿Cuántos años tiene?	
¿Cuál es su fecha de nacimiento? -día, mes, año-	
¿Quién es ahora el presidente del gobierno?	
¿Quién fue el anterior presidente del gobierno?	
¿Cuáles son los dos apellidos de su madre?	
Vaya restando de 3 en 3 al número 20 hasta llegar al 0.	
PUNTUACIÓN TOTAL	

0-2 errores: normal

3-7 errores: deterioro cognitivo leve-moderado

8-10 errores: deterioro cognitivo severo

** Con baja escolarización se permite un error más.

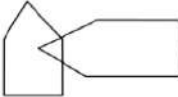
** Con estudios superiores se contabiliza con un error menos.

Nivel de estudios

Elemental	Bachillerato	Universitario
-----------	--------------	---------------

Mini-mental test

ORIENTACIÓN	
• Digame el día..... fecha Mes..... Estación..... Año.....	___5
• Digame el hospital (o lugar).....	
planta..... ciudad..... Provincia..... Nación.....	___5
FIJACIÓN	
• Repita estas tres palabras ; peseta, caballo, manzana (hasta que se las aprenda)	___3
CONCENTRACIÓN Y CÁLCULO	
• Si tiene 30 ptas. y me dando de tres en tres ¿cuantas le van quedando ?	___5
• Repita estos tres números : 5,9,2 (hasta que los aprenda) .Ahora hacia atrás	___3
MEMORIA	
• ¿Recuerda las tres palabras de antes ?	___3
LENGUAJE Y CONSTRUCCIÓN	
• Mostrar un bolígrafo. ¿Qué es esto ?, repetirlo con un reloj	___2
• Repita esta frase : En un trigal había cinco perros	___1
• Una manzana y una pera ,son frutas ¿verdad ? ¿qué son el rojo y el verde ?	___2
• ¿Que son un perro y un gato ?	___3
• Coja este papel con la mano derecha dóblelo y póngalo encima de la mesa	___1
• Lea esto y haga lo que dice : CIERRE LOS OJOS	___1
• Escriba una frase	___1
• Copie este dibujo ___1	___1



Puntuación máxima 35.
Punto de corte Adulto no geriátricos 24
Adulto geriátrico 20

Años de escolarización:

Puntuación	
------------	--

Deterioro cognitivo:

< 23 puntos en población geriátrica con escolarización normal
< 20 puntos en población geriátrica con baja escolaridad o analfabetismo.

5.- PARÁMETROS DEMOGRÁFICOS Y SITUACIÓN SOCIAL

Estado civil

Soltero/a	Casado/a	Separado/a	Viudo/a
-----------	----------	------------	---------

Composición del hogar

Vive solo/a	Acompañado/a
-------------	--------------

Escala de valoración del apoyo social (MOS simplificada)

	Nunca	Pocas veces	Ni mucho ni poco	Casi siempre	Siempre
Alguien en quien confiar o hablar de sus problemas	1	2	3	4	5
Alguien con quien relajarse	1	2	3	4	5
Alguien que le ayude en sus tareas diarias	1	2	3	4	5
Alguien que le aconseje cómo resolver sus problemas	1	2	3	4	5
Alguien a quien amar y sentirse querido	1	2	3	4	5

Escala de situación socio-familiar (Gijón)

1.- Situación familiar

Vive con familiar sin dependencia físico-psíquica	1
Vive con cónyuge de similar edad	2
Vive con familia y/o cónyuge y presenta algún grado de dependencia	3
Vive solo y tiene hijos próximos	4
Vive solo y carece de hijos o viven alejados	5

2.- Vivienda

Adecuada a las necesidades	1
Barreras arquitectónicas en la vivienda o portal de la casa (peldaños, puertas estrechas, baños...)	2
Humedades, mala higiene, equipamiento inadecuado (sin baño completo, agua caliente, calefacción...)	3
Ausencia de ascensor, teléfono	4
Vivienda inadecuada (chabolas, vivienda declarada en ruina, sin equipamiento mínimo)	5

3.- Relaciones sociales

Relaciones sociales	1
Relación social sólo con familia y vecinos	2
Relación social sólo con la familia o vecinos	3
No sale del domicilio, recibe visitas	4
No sale del domicilio ni recibe visitas	5

4.- Apoyo de la red social

Con apoyo familiar o vecinal	1
Voluntariado social, ayuda domiciliaria	2
No tiene apoyo	3
Pendiente de ingreso en residencia	4
Tiene cuidados permanentes	5

≤ 7 pts: situación social buena (bajo riesgo de institucionalización).

8-9 pts: situación intermedia.

≥ 10 pts: deterioro social severo (alto riesgo de institucionalización).

6.- SITUACIÓN EMOCIONAL

Escala Geriátrica de Depresión (GDS) de Yesavage (versión reducida)

	SÍ	NO
1. ¿Está básicamente satisfecho/a con su vida?	0	1
2. ¿Ha renunciado a muchas actividades y aficiones?	1	0
3. ¿Siente que su vida está vacía?	1	0
4. ¿Se siente a menudo aburrido/a?	1	0
5. ¿Tiene a menudo buen ánimo?	0	1
6. ¿Tiene miedo de que le ocurra algo malo?	1	0
7. ¿Se siente contento/a la mayor parte del tiempo?	0	1
8. ¿Se siente a menudo indefenso/a?	1	0
9. ¿Prefiere quedarse en casa más que salir y hacer cosas nuevas?	1	0
10. ¿Cree que tiene más problemas de memoria que la mayoría de las personas de su edad?	1	0
11. ¿Cree que es maravilloso estar vivo?	0	1
12. ¿Se siente bastante inútil tal y como está ahora?	1	0
13. ¿Se siente lleno/a de energía?	0	1
14. ¿Piensa que su situación es desesperada?	1	0
15. ¿Cree que la mayoría de la gente está mejor que usted?	1	0

Resultados: 0-5 = Normal; 6-9 = Depresión leve; ≥ 10 Depresión establecida.

Escala de ansiedad-depresión

<p>A1. Me siento tenso/a o nervioso/a: 3. Casi todo el tiempo 2. Gran parte del día 1. De vez en cuando. 0. Nunca</p>	<p>D1. Sigo disfrutando de las cosas como siempre: 0. Ciertamente, igual que antes. 1. No tanto como antes. 2. Solamente un poco. 3. Ya no disfruto con nada</p>
<p>A2. Siento una especie de temor como si algo malo fuera a suceder: 3. Sí, y muy intenso. 2. Sí, pero no muy intenso. 1. Sí, pero no me preocupa. 0. No siento nada de eso.</p>	<p>D2. Soy capaz de reírme y ver el lado gracioso de las cosas: 0. Igual que siempre. 1. Actualmente algo menos. 2. Actualmente mucho menos 3. Actualmente en absoluto</p>
<p>A3. Tengo la cabeza llena de preocupaciones: 3. Casi todo el día. 2. Gran parte del día. 1. De vez en cuando. 0. Nunca.</p>	<p>D3. Me siento alegre: 3. Nunca 2. Muy pocas veces. 1. En algunas ocasiones. 0. Gran parte del día</p>
<p>A4. Soy capaz de permanecer sentado/a tranquilo/a y relajado/a: 0. Siempre 1. A menudo 2. Raras veces. 3. Nunca.</p>	<p>D4. Me siento lento/a y torpe: 3. Gran parte del día. 2. A menudo. 1. A veces. 0. Nunca</p>
<p>A5. Experimento una desagradable sensación de nervios y hormigueos en el estómago: 0. Nunca 1. Sólo en algunas ocasiones. 2. A menudo. 3. Muy a menudo.</p>	<p>D5. He perdido el interés por mi aspecto personal: 3. Completamente. 2. No me cuido como debería hacerlo. 1. Es posible que no me cuido como debiera. 0. Me cuido como siempre.</p>
<p>A6. Me siento inquieto/a como si no pudiera parar de moverme: 3. Realmente mucho. 2. Bastante. 1. No mucho. 0. En absoluto.</p>	<p>D6. Espero las cosas con ilusión. 0. Como siempre. 1. Algo menos que antes. 2. Mucho menos que antes. 3. En absoluto.</p>
<p>A7. Experimento de repente sensaciones de gran angustia o terror. 3. Muy a menudo. 2. Con cierta frecuencia. 1. Raramente. 0. Nunca</p>	<p>D7. Soy capaz de disfrutar con un buen libro o con un buen programa de radio o televisión: 0. A menudo. 1. Algunas veces. 2. Pocas veces. 3. Casi nunca.</p>

0-7 no indica caso; 8-10 caso dudoso; > 11: probable caso (ansiedad/depres).

7.- COMORBILIDAD

Escala de Charlson

Índice de comorbilidad de Charlson.

<u>Enfermedades comórbidas</u>	<u>Puntuación asignada</u>
Cardiopatía Isquémica	1
Insuficiencia cardíaca congestiva	1
Enfermedad vascular periférica	1
Enfermedad cerebrovascular	1
Demencia	1
Enfermedad pulmonar crónica	1
Enfermedad reumática	1
Úlcera péptica	1
Enfermedad hepática leve	1
Hipertensión Arterial	1
Diabetes Mellitus	2
Hemiplejía o paraplejía	2
Enfermedad renal	2
Tumores malignos	2
Enfermedad hepática moderada o grave	3
Tumor sólido <u>metastásico</u>	6
SIDA	6

CIRS-G (cumulative illness ratings scale for geriatrics)

Instrucciones: Referir al manual de CIRS-G. Escriba una breve descripción del problema médico que justifica la puntuación otorgada en la línea que sigue a cada categoría. (Use el reverso de la página para mayor espacio).

Estrategia de puntuación

- 0 Sin problema
- 1 Problema actual leve o en el pasado problema significativo
- 2 Discapacidad moderada, o morbilidad que requiere tratamiento de primera línea
- 3 Discapacidad constante/severa o problemas crónicos de difícil control
- 4 Problema extremadamente severo que requiere de atención inmediata o insuficiencia orgánica terminal, o severa alteración en la función

	Puntuación
Cardíaco	_____
Vascular	_____
Hematopoyético	_____
Respiratorio	_____
Ojos, oídos, nariz, garganta y laringe	_____
Gastrointestinal superior	_____
Gastrointestinal inferior	_____
Hígado	_____
Renal	_____
Genitourinario	_____
Musculoesquelético/tegumentario	_____
Neurológico	_____
Endocrino/metabólico y mamario	_____
Enfermedad psiquiátrica	_____
Número total de categorías endosadas	_____
Puntuación total	_____
Índice de severidad (puntuación total/total de categorías endosadas)	_____
Número de categorías en el nivel tres de severidad	_____
Número de categorías en el nivel cuatro de severidad	_____

No existe un punto de corte establecido.

9.- SÍNDROMES GERIÁTRICOS

Demencia	
<i>Delirium</i>	
Incontinencia	
Depresión	
Caídas	