





Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

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

TESI DOCTORAL

**ESTUDI DE LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA EN EL VESSAMENT PLEURAL MALIGNA DE PACIENTS
AMB ADENOCARCINOMA PULMONAR**

AUTORA:

Maria Mulet Gual

DIRECTORS:

Silvia Vidal Alcorisa

Carlos Zamora Atenza

Programa de Doctorat en Immunologia Avançada

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

IIB Institut de Recerca Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Universitat Autònoma de Barcelona, 2022

RESOLUCIÓ DE PRESENTACIÓ DE LA TESI COM A COMPENDI DE PUBLICACIONS

En la reunió del dia 9 de setembre de 2022 de la Comissió Acadèmica del Programa de Doctorat en Biologia Cel·lular, d'acord amb la normativa Acadèmica de la Universitat Autònoma de Barcelona aplicable als Estudis universitaris regulats de conformitat amb el RD 1393/2007, de 29 d'octubre, modificat pel RD 861/2010, de 2 de juliol.

Ha resultat,

- Autoritzar
- No autoritzar

la presentació de la tesi de la Sra. **Maria Mulet Gual** de títol "*Estudi de la resposta Immunitària en el vessament pleural maligne de pacients amb adenocarcinoma pulmonar*" en forma de compendi de publicacions a la Universitat Autònoma de Barcelona.

Iñaki Álvarez
Coordinador del programa de Doctorat en Immunologia Avançada

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), a 9 de setembre de 2022

Agraïments

Aquest projecte no hauria estat possible sense l'ajuda i el suport de varies persones a les que m'agradaria expressar el meu agraïment.

En primer lloc als directors d'aquesta tesi, a la Silvia Vidal, per haver-me donat l'oportunitat de formar part del seu grup de recerca des de les pràctiques del màster d'Immunologia, per motivar-me i haver-me tramés il·lusió per a la investigació. Al Carlos Zamora, per haver-me format i ensenyat tot el que cal saber per ser una bona científica. Agrair-li també la paciència que ha tingut i el fet d'estar sempre disposat a resoldre els problemes que poguessin sorgir. Gràcies per haver-me ensenyat a ser crítica a l'hora d'interpretar els resultats.

Als companys de laboratori, al Rubén, la Lúdia, la Bet, la M^a Angels, el Jose, l'Albert, la Edilmar, la Lia, la Carla, l'Anaís i la Leticia pels bons moments compartits dia rere dia i estar predisposats a ajudar sempre que fos necessari.

A tots els membres del servei d'Immunologia per contribuir en la meva formació.

Al José Manuel Porcel, la Vicky Pajares i la Núria Calvo per la seva disposició a col·laborar amb el projecte i facilitar l'arribada de les mostres necessàries per dur a terme aquest estudi.

A la meva família, amics i parella per tot el seu suport durant aquest camí, per animar-me i alegrar-se dels meus èxits com si fossin els seus propis.

LLISTAT D'ABREVIACIONS

ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
ADP	Adenosine diphosphate
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
BCR	Receptor de limfòcits B
Breg	Limfòcit B regulador
CA 15-3	Antigen carbohidrat 15-3
CCR	<i>C-C chemokine receptor</i>
CD40L	Lligand de CD40
CEA	Antigen carcembrionari
CIP	Catèters intrapleurals permanents
CPCNP	Càncer de pulmó de cèl·lula no petita
CPCP	Càncer de pulmó de cèl·lula petita
CSF	<i>Colony stimulating Factor</i>
CXCL	<i>CXC chemokine ligand</i>
DNA	Àcid desoxirribonucleic
ECOG PS	<i>Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status</i>
EGF	Factor de creixement epidèrmic
EGFR	Receptor del factor de creixement epidèrmic
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENA-78	<i>Epithelial neutrophil-activating peptide-78</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
HMGB1	Proteïna d'alta mobilitat del grup 1
IC	Insuficiència cardíaca congestiva
ICAM-1	Molècula d'adhesió intracel·lular-1
ICC	Immunocitoquímica
IFN-γ	Interferó gamma
Ig	Immunoglobulina
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL	Interleucina
ILCs	<i>Innate lymphoid cells</i>
LAMP	<i>Lysosome-associated membrane glycoprotein</i>
LAP	<i>Latency-associated peptide</i>
LDH	Lactat deshidrogenasa
LTB4	Leucotriè B4
LTBPs	<i>Latent TGF-β binding proteins</i>
MCP-1	Proteïna quimioatracent de monòcits 1
MDSC	Cèl·lula supressora d'origen mieloide
MEC	Matriu extracel·lular
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MMP	Metal·loproteïnasa de matriu
MPO	Mieloperoxidasa
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NT-proBNP	Propèptid natriurètic cerebral N-terminal
PBMCs	Cèl·lules mononuclears de sang perifèrica
PCR	Proteïna C reactiva
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PF4	Factor plaquetari IV

PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PMPs	<i>Platelet-derived microparticles</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand 1</i>
RMN	Ressonància magnètica
RNA	Àcid ribonucleic
RNAm	Àcid ribonucleic missatger
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
TAMs	<i>Tumor-associated macrophages</i>
TC	Tomografia computada
TCR	Receptor de limfòcits T
TGF-β	Factor de creixement transformant beta
Th	<i>Helper T lymphocyte</i>
TKI	Inhibidors tirosina quinasa
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Factor de necrosis tumoral <i>alpha</i>
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Treg	Limfòcit T regulador
VCAM-1	Molècula d'adhesió vascular 1
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
VP	Vessament pleural
VPB	Vessament pleural benigne
VPM	Vessament pleural maligne
vWf	<i>Von Willebrand factor</i>

ÍNDIX

1. RESUM	3
1.1. RESUM DE LA TESI I LES PUBLICACIONS DERIVADES.....	3
2. INTRODUCCIÓ	9
2.1. LA PLEURA: ANATOMIA I FISIOLOGIA PLEURAL	11
2.2. EL VESSAMENT PLEURAL.....	12
2.2.1. Etiologia del vessament pleural	12
2.2.2. Tècniques per al diagnòstic del vessament pleural.....	14
2.2.3. Biomarcadors pleurals de diagnòstic	17
2.3. VESSAMENT PLEURAL MALIGNA	19
2.3.1. Pronòstic dels pacients amb vessament pleural maligna	20
2.3.2. Biomarcadors pleurals de pronòstic	21
2.3.3. Tractaments pel vessament pleural maligna	22
2.4. FORMACIÓ DEL VESSAMENT PLEURAL MALIGNA	25
2.5. EL SISTEMA IMMUNITARI EN EL MICROAMBIENT TUMORAL DEL VESSAMENT PLEURAL MALIGNA	28
2.5.1. Sistema immunitari innat	28
2.5.1.1. <i>Monòcits i macròfags</i>	30
2.5.1.2. <i>Neutròfils</i>	33
2.5.1.3. <i>Plaquetes</i>	38
2.5.2. Sistema immunitari adaptatiu.....	40
2.5.2.1. <i>Limfòcits T</i>	42
2.5.2.2. <i>Limfòcits B</i>	45
2.6. FACTORS SOLUBLES IMMUNOMODULADORS PRESENTS EN VESSAMENT PLEURAL MALIGNA	48
2.6.1. TNF- α	48
2.6.2. IFN- γ	49
2.6.3. IL-8.....	49
2.6.4. IL-6.....	50
2.6.5. IL-17.....	51
2.6.6. IL-10.....	52
2.6.7. TGF- β	53
2.6.8. VEGF	54
2.6.9. PF4.....	55
2.6.10. P-selectina	56
2.6.11. CD40L	57
2.6.12. PD-L1	57
3. HIPÒTESI I OBJECTIUS	59
3.1. HIPÒTESI.....	61
3.2. OBJECTIUS	61
4. PUBLICACIONS	63

4.1.	ARTICLE 1.1.....	65
4.2.	ARTICLE 1.2.....	79
4.3.	ARTICLE 2.....	89
5.	RESUM GLOBAL DE RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	107
5.1.	ARTICLE 1.1.....	109
5.1.1.	Resum global dels resultats.....	109
5.1.2.	Discussió i rellevància.....	111
5.2.	ARTICLE 1.2.....	113
5.2.1.	Resum global dels resultats.....	113
5.2.2.	Discussió i rellevància.....	114
5.3.	ARTICLE 2.....	116
5.3.1.	Resum global dels resultats.....	116
5.3.2.	Discussió i rellevància.....	118
6.	CONCLUSIONS.....	121
7.	BIBLIOGRAFIA.....	125

1. RESUM

1.1. RESUM DE LA TESI I LES PUBLICACIONS DERIVADES

El vessament pleural maligne (VPM) es defineix com l'acumulació significativa de líquid pleural acompanyat de cèl·lules tumorals. És una complicació clínica força freqüent associada al càncer de pulmó avançat; en particular, a l'adenocarcinoma. L'aparició del VPM es relaciona amb un mal pronòstic amb una esperança de vida d'entre 3 i 12 mesos. Malgrat disposar de diverses tècniques de diagnòstic, s'estima que al voltant del 20% dels casos queden sense diagnosticar o són classificats erròniament. Pel que fa als tractaments, són en gran mesura pal·liatius i estan enfocats a drenar o minimitzar l'espai pleural per evitar l'acumulació de líquid. L'anàlisi de la composició molecular i cel·lular del líquid pleural pot ser útil per a trobar nous marcadors que confereixin un diagnòstic més ràpid i acurat del VPM o ajudin a predir la progressió del malalt. És probable que d'aquesta manera s'identifiquin noves dianes per al desenvolupament de teràpies dirigides amb l'objectiu d'allargar l'esperança de vida d'aquests pacients. El VPM constitueix un medi únic per estudiar les interaccions entre les cèl·lules tumorals i les cèl·lules del sistema immunitari. Hi ha evidències de l'increment de molècules antiinflamatòries en els VPM, com el factor de creixement transformant beta (TGF- β) i la IL-10, suggerint un entorn immunosupressor. Els factors secretats per les plaquetes també juguen un paper important promovent el creixement i la disseminació del càncer. Tot i això, la resposta immunitària en el VPM requereix ser estudiada amb més detall per acabar d'entendre els mecanismes immunològics que tenen lloc en el VPM i contribueixen a la progressió de la malaltia.

L'objectiu general del treball ha estat caracteritzar a nivell molecular i cel·lular el microambient tumoral del VPM per identificar molècules implicades en la modulació de la resposta immunitària, en especial aquells factors solubles derivats de la plaqueta. El primer article (article 1.1.) s'ha centrat a estudiar l'efecte del VPM sobre les funcions dels limfòcits T, mentre que el segon (article 2) s'ha analitzat l'efecte del VPM sobre les funcions dels neutròfils. En ambdós treballs s'ha relacionat la composició molecular del vessament pleural amb les funcions dels limfòcits T (article 1.1) i dels neutròfils (article 2). Un altre objectiu comú dels dos treballs ha estat determinar el valor diagnòstic i pronòstic de les molècules i funcions immunitàries alterades en el VPM. Finalment, també hi ha un article complementari a l'article 1.1. (article 1.2), on s'ha analitzat la procedència d'una molècula, en particular, que es va identificar en l'article 1.1 com a implicada en la modulació de les funcions dels limfòcits T en el VPM. A més, s'ha considerat la influència de factors solubles derivats de la plaqueta sobre les funcions dels limfòcits T i el seu valor com a predictors de pronòstic en pacients amb VPM.

A continuació, es resumeixen els resultats de cada publicació.

ARTICLE 1.1. Platelet factor 4 regulates T cell effector functions in malignant pleural efusions

Maria Mulet*, Carlos Zamora*, José M Porcel, Juan C Nieto, Virginia Pajares, Ana M Muñoz-Fernandez, Núria Calvo, Aureli Esquerda, Silvia Vidal

Cancer Letters, 2020 Oct 28; 491: 78-86. Factor d'impacte: 7.85 (Primer Quartil).

**Els autors van contribuir de la mateixa manera en l'article.*

Amb l'objectiu d'estudiar la resposta dels limfòcits T en el VPM, es van recollir líquids pleurals de pacients amb adenocarcinoma pulmonar (VPM; n=35) i líquids pleurals de pacients amb insuficiència cardíaca congestiva (IC) (vessaments pleurals benignes (VPBs); n=20) com a grup control representatiu de no-malignitat. Es va dissenyar un model de cultiu *in vitro* que simulés el microambient tumoral del VPM. Per aconseguir-ho, es van aïllar cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs) de donants sans i es van estimular amb un kit d'activació de limfòcits T en presència de VPMs o VPBs durant 72 h (**figura 1**). En primer lloc, es va comparar l'efecte del VPM i el VPB sobre la capacitat proliferativa i citotòxica dels limfòcits T per citometria de flux. Els resultats mostren una disminució de l'activació, la proliferació i l'expressió de granzim B en els limfòcits T estimulats en presència VPMs en comparació amb VPBs. No obstant això, l'expressió de perforina en els limfòcits T era similar en ambdós tipus de VPs. Pel que fa a la producció de citocines, es van mesurar els nivells de IL-17, IL-10 i IFN- α en els sobrenedants dels cultius d'activació de limfòcits T en presència de VPs per mitjà d'ELISAs. Els nivells de IL-17 disminuïen significativament, mentre que els de IL-10 tendien a augmentar i els d'IFN- γ a disminuir en presència de VPMs en comparació amb VPBs; afavorint una resposta antiinflamatòria. Seguidament, es va caracteritzar la composició molecular del microambient tumoral del VPM mitjançant ELISAs. Es van quantificar concentracions més elevades de factors alliberats principalment per la plaqueta, inclosos PF4, TGF- β , P-selectina i VEGF (de l'anglès, *vascular endothelial growth factor*), en VPMs en comparació amb VPBs. A més a més, el patró d'associacions entre aquestes molècules variava en funció de l'etiologia del VP. En VPMs, la concentració de VEGF es correlacionava positivament amb la de P-selectina i PD-L1 soluble. En canvi, en VPBs, la concentració de VEGF es correlacionava negativament amb la de P-selectina. En ambdós tipus de VPs, la concentració de P-selectina es correlacionava positivament amb la de TGF- β . A nivell sistèmic, la concentració de PF4 i P-selectina en plasma era major que en VPs i similar en ambdós tipus de patologies. Pel que fa a l'associació entre els factors plaquetaris i

les funcions dels limfòcits T en els VPs, es va observar que la concentració pleural de PF4 es correlacionava negativament amb l'activació, la proliferació i l'expressió del granzim B dels limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺ en VPMs. Es va validar l'efecte immunosupressor del PF4 *in vitro* sobre PBMCs estimulades amb el kit d'activació de limfòcits T durant 72 h. En línia amb els resultats anteriors, el PF4 recombinant reduïa la proliferació i l'expressió de granzim B dels limfòcits T. A més a més, el PF4 no alterava l'expressió d'inhibidors de punts de control immunitari (BTLA, LAG-3, PD-L1, PD-1, TIGIT ni TIM-3) en els limfòcits T. La producció de IL-10 era significativament major en presència de PF4, mentre que els nivells d'IFN- γ i IL-17 tendien a ser més elevats. Clínicament, els pacients amb adenocarcinoma pulmonar que presentaven concentracions més elevades de PF4 en el VPM tenien un pitjor pronòstic. Aquests resultats suggereixen que la disminució de la resposta dels limfòcits T associada al PF4 estaria facilitat la progressió tumoral.

ARTICLE 1.2. Experimental supporting data on the influence of platelet-derived factors of malignant pleural effusions on T cell effector functions and their relevance in predicting prognosis of lung adenocarcinoma patients with pleural metastasis

Maria Mulet*, Carlos Zamora*, José M Porcel, Juan C Nieto, Virginia Pajares, Ana M Muñoz-Fernandez, Núria Calvo, Aureli Esquerda, Silvia Vidal

Data in Brief, 2020 Oct; 32:106266. Factor d'impacte: 1.38.

**Els autors van contribuir de la mateixa manera en l'article.*

Aquesta publicació presenta resultats complementaris a l'article 1.1 "*Platelet factor 4 regulates T cell effector functions in malignant pleural efusions*". La cohort de pacients és la mateixa que en l'article principal 1.1; 35 pacients amb VPM derivat d'un adenocarcinoma pulmonar i 20 pacients amb VPB originat per la IC.

L'objectiu principal d'aquest article era estudiar l'origen del PF4 dels VPs, ja que en l'article 1.1 s'havia relacionat aquesta molècula amb la immunosupressió dels limfòcits T en el VPM. Es va comparar la producció espontània de PF4 per part de les cèl·lules aïllades dels VPMs i VPBs després de 72 h de cultiu. En paral·lel, es va comparar la producció de PF4 per part de les cèl·lules aïllades dels VPMs i VPBs estimulades amb el kit d'activació de limfòcits T durant 72 h de cultiu. La quantificació dels nivells de PF4 produïts en els sobrenedants d'ambdós tipus de cultiu es va dur a terme mitjançant la tècnica ELISA (**figura 1**). En ambdós casos, la producció

de PF4 va ser major en els sobrenedants dels cultius de cèl·lules dels VPMs, tot i que els nivells eren pràcticament insignificants en comparació amb les concentracions basals dels VPs. A més a més, els nivells pleurals de PF4 no s'associaven amb el nombre de limfòcits T CD4⁺ ni CD8⁺ que hi havia originalment en els VPMs. El segon objectiu era relacionar els altres factors solubles derivats de la plaqueta, augmentats en els VPMs, amb les funcions dels limfòcits T prèviament analitzades en l'article 1.1. No es va observar cap tipus d'associació entre els nivells de TGF- β , P-selectina i VEGF dels VPMs i la proliferació i l'expressió del granzim B dels limfòcits T. Per últim, el tercer objectiu era determinar si, a banda del PF4, els altres factors plaquetaris mesurats podien ser útils com a predictors de pronòstic en pacients amb VPM derivat d'adenocarcinoma pulmonar. Les corbes de Kaplan-Meier mostraven que els nivells pleurals de TGF- β , P-selectina i VEGF no semblaven influir en la taxa de supervivència global dels pacients amb VPM i que, per tant, no eren bons predictors de pronòstic pels pacients amb VPM derivat d'adenocarcinoma pulmonar.

ARTICLE 2. Influence of Malignant Pleural Fluid from Lung Adenocarcinoma Patients on Neutrophils Response

Maria Mulet, Rubén Osuna-Gómez, Carlos Zamora, José M. Porcel, Juan C. Nieto, Lúdia Perea, Virginia Pajares, Ana M. Muñoz-Fernandez, Nuria Calvo, Maria Alba Sorolla, Silvia Vidal.

Cancers, 2022 May; 14(10):2529. Factor d'impacte: 6.578 (Primer Quartil).

Amb l'objectiu d'estudiar la resposta dels neutròfils en el VPM, es van recollir líquids pleurals de pacients amb adenocarcinoma pulmonar (VPMs; n=47) i líquids pleurals de pacients amb IC (VPBs; n=25), com a control no-maligne. En primer lloc, es van quantificar els nivells de mieloperoxidasa (MPO), lactoferrina i metaloproteïnasa-9 (MMP-9), molècules representatives de la desgranulació dels neutròfils, en ambdós tipus de VPs mitjançant ELISAs. Es va observar que la concentració d'aquestes molècules era significativament major en els VPMs que en els VPBs. A més a més, la concentració de IL-8, un factor quimiotàctic de neutròfils, també era superior en els VPMs tot i no correlacionar-se amb la quantitat de neutròfils dels VPs. En avaluar el potencial diagnòstic d'aquestes molècules, la MPO va ser la molècula que va presentar més especificitat i la IL-8 més sensibilitat a l'hora de distingir els VPMs dels VPBs. A continuació, es va estudiar l'efecte dels líquids pleurals sobre les funcions del neutròfil. Es van aïllar neutròfils de la sang perifèrica de donants sans i es van cultivar en presència de VPMs o VPBs per simular l'entorn del VP (**figura 1**). Es va analitzar la capacitat dels VPs d'induir

l'apoptosi dels neutròfils i la producció d'espècies reactives de l'oxigen (ROS) per citometria de flux i, la formació de trapes extracel·lulars dels neutròfils (NETs) per fluorescència. Els resultats van mostrar que els VPMs promouien la supervivència dels neutròfils i la formació de NETs, mentre que reduïen la capacitat de produir ROS en comparació amb els VPBs. Tot i que la capacitat de produir NETs davant d'un estímul era major en els VPMs, no s'associava amb el contingut basal de DNA extracel·lular present en el VP. Aquest fet s'explicaria possiblement per l'existència de diverses fonts de DNA extracel·lular. Donada la importància de les interaccions entre el neutròfil i la plaqueta en la progressió tumoral, es va analitzar la relació entre els nivells pleurals dels factors plaquetaris i les funcions dels neutròfils. Aquesta anàlisi va revelar diferents patrons d'associació en funció de l'etiologia del VP. En els pacients amb VPM, la NETosi es correlacionava directament amb els nivells pleurals de MMP-9, la P-selectina i PD-L1 soluble i presentava una tendència negativa amb els nivells de lactoferrina. En canvi, en els pacients amb VPB, la NETosi es correlacionava directament amb els nivells de MPO, MMP-9 i PF4. Des del punt de vista clínic, la supervivència dels pacients amb VPM s'associava positivament amb els nivells pleurals de lactoferrina però negativament amb la NETosi. A més a més, els nivells pleurals de lactat deshidrogenasa (LDH) i proteïna C reactiva (PCR) es correlacionaven directament amb els nivells de lactoferrina, MMP-9 i MPO en els VPMs, suggerint la contribució del neutròfil a la inflamació pleural.

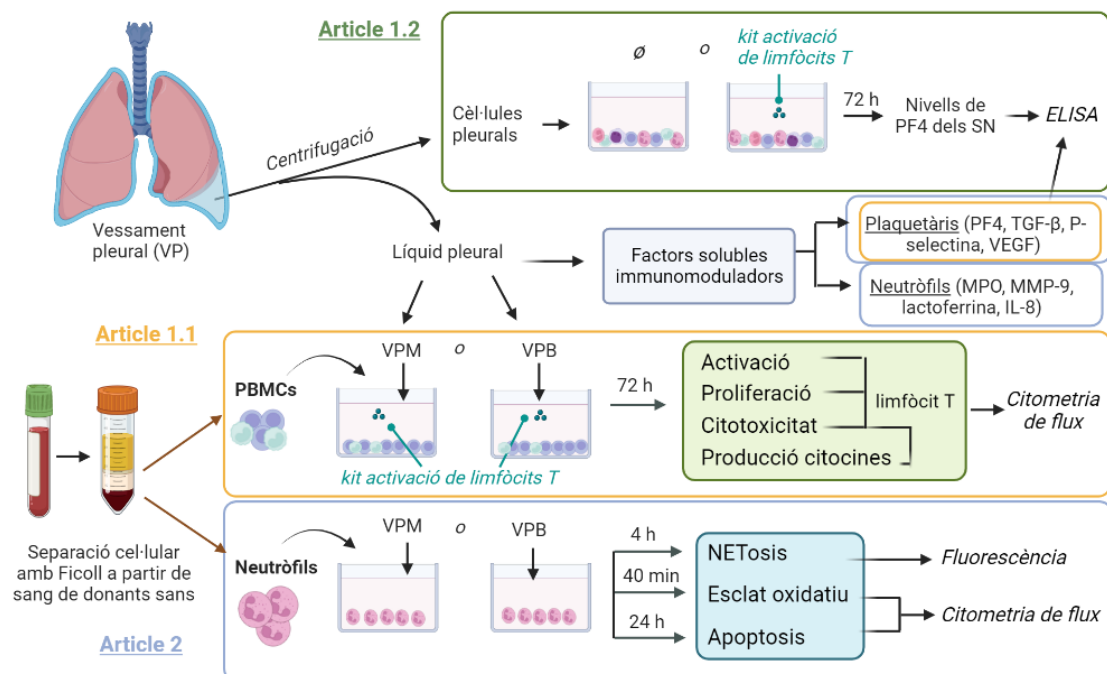


Figura 1. Estratègia experimental aplicada en cadascun dels articles (imatge creada amb Biorender.com).

2. INTRODUCCIÓ

2.1. LA PLEURA: ANATOMIA I FISIOLOGIA PLEURAL

Els pulmons són els òrgans funcionals del sistema respiratori, permeten l'entrada de l'oxigen a la sang i l'eliminació del diòxid de carboni. Es troben recoberts d'una membrana serosa anomenada pleura que al mateix temps es divideix en dues capes: la pleura visceral i la pleura parietal¹. La pleura visceral es troba adherida firmament a la superfície externa del pulmó mentre que la parietal recobreix la paret interior del tòrax. Ambdues capes es fusionen en l'hil pulmonar i delimiten entre si un espai virtual reduït, d'uns 10-20 µm, conegut com a cavitat pleural². En condicions fisiològiques, aquesta cavitat conté una petita quantitat de líquid serós (al voltant d'uns 0,26 ml/kg de pes corporal) que permet la lubricació dels pulmons i facilita la inhalació i l'exhalació³. El líquid pleural es produeix i s'absorbeix principalment en la pleura parietal. En un individu sà, l'entrada i sortida de líquid de l'espai pleural es manté en equilibri constant seguint els gradients de pressió oncòtica e hidrostàtica⁴. Les dues capes actuen com a membranes semipermeables, de manera que la concentració de molècules de baix pes molecular en el líquid pleural és similar a la del plasma, mentre que les macromolècules, com l'albumina, es troben més concentrades en el plasma. Tant la pleura visceral com la parietal consten d'una monocapa de cèl·lules mesotelials metabòlicament actives. Aquestes cèl·lules presenten microvellositats a la regió apical per augmentar la superfície útil de transport del líquid^{2,5}. Les característiques i el volum de líquid pleural estan condicionats per diversos processos dinàmics que afecten la circulació sistèmica i pulmonar, el drenatge limfàtic i els moviments de la caixa toràcica i del cor⁶. En condicions fisiològiques, la composició cel·lular i bioquímica del líquid pleural (**taula 1**) no presenta diferències pel que fa al sexe, tot i que el percentatge de neutròfils pot augmentar lleugerament en fumadors⁷⁻¹⁰.

Taula 1. Composició cel·lular i bioquímica de líquid pleural en condicions fisiològiques (adaptada de *Noppen, M. Paediatr. Respir. Rev. 2004; Kinasewitz, GT. Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders. 1998*).

Composició cel·lular	
Cèl·lules totals/mm³	1.000-5.000
• Cèl·lules mesotelials	0-2 %
• Macròfags	64-81 %
• Neutròfils	0-2%
• Limfòcits (proporció CD4/CD8)	16-31 % (0.47-1.36)
Composició bioquímica	
Glucosa	Similar als nivells plasmàtics
Proteïnes	1-2 g/dl
Lactat deshidrogenasa (LDH)	< 50% del valor plasmàtic
pH	Similar als nivells plasmàtics (7,6- 7,64)

2.2. EL VESSAMENT PLEURAL

Es coneixen diverses situacions que poden desencadenar un desequilibri entre la formació i l'absorció de líquid pleural provocant que aquest s'acumuli donant lloc al que es coneix com a vessament pleural (VP). La formació d'un VP és un procés patològic i, per tant, requereix ser estudiat per determinar-ne l'origen i el tractament més adequat. La incidència d'aparició es troba al voltant de 1,5 milions de casos per any als Estats Units i s'estima que els costos sanitaris associats ronden els 722 milions de dòlars¹¹. Els mecanismes implicats en la formació del VP són: l'augment de la pressió hidrostàtica, el descens de la pressió oncòtica, l'alteració del drenatge limfàtic, l'augment de la permeabilitat en la microcirculació pleural i/o l'arribada de líquid des del peritoneu a través de petites comunicacions transdiafragmàtiques¹².

2.2.1. Etiologia del vessament pleural

Per tal de tractar els VPs de forma adequada, és necessari determinar-ne l'etiologia. Un dels primers passos a l'hora d'avaluar els pacients amb líquid pleural és distingir aquells que pateixen un VP inflamatori (exsudat) dels que tenen un VP no-inflamatori (transsudat)¹³. Clàssicament, es van establir una sèrie de criteris per diferenciar aquestes dues entitats, els criteris Light, que ofereixen una sensibilitat d'entre el 93-100% i una especificitat del 80%. Segons aquests criteris¹⁴, un VP es considera exsudat quan compleixi alguna de les següents condicions, mentre que un transsudat no n'ha de complir cap:

- La relació entre les proteïnes del líquid pleural i les proteïnes del sèrum superior a 0,5.
- La relació entre la LDH del líquid pleural i la sèrica superior a 0,6.
- Els nivells de la LDH pleural majors que 2/3 del límit superior en sèrum.

Un **transsudat** s'origina per un desequilibri en la distribució de les pressions hidrostàtica i oncòtica de la pleura. En aquest cas, les membranes pleurals estan intactes i els capil·lars de l'endoteli preserven les seves característiques de condicions fisiològiques no patològiques¹⁵. La IC és la principal causa de transsudat, representa al voltant del 80% dels casos i es forma per un augment de la pressió hidrostàtica^{16,17}. Aquest grup de pacients es fa servir habitualment com a grup control de no-malignitat en l'estudi de la resposta immunitària dels exsudats malignes. Aproximadament el 50% dels pacients amb IC desenvoluparan un VP en el transcurs de la malaltia. El VP associat a IC sol ser bilateral, tot i que en comptades ocasions es troba localitzat al costat dret. La hipertensió venosa pulmonar sembla ser la principal causa de la

formació de VP en pacients amb IC¹⁸. Altres patologies menys freqüents que poden anar associades a la formació de transsudat són: la cirrosi hepàtica, la síndrome nefròtica, la diàlisi peritoneal, la pericarditis constructiva i l'obstrucció de la vena cava superior¹⁹.

Un **exsudat**, a diferència del transsudat, es forma quan hi ha una pèrdua de la integritat de la membrana pleural lligada a un augment de la permeabilitat vascular i de la producció de líquid. Les causes més comuns associades a la formació d'un exsudat són les metàstasis pleurals i les infeccions pulmonars com la pneumònia o la tuberculosi^{20,21}. Estan descrites més de 50 causes associades a la formació d'un exsudat, algunes d'elles es mostren a la **taula 2**.

Taula 2. Classificació dels exsudats en funció de l'origen (adaptada de *Jany, B. Dtsch. Arztebl. Int. 2019; Karkhanis, V.S. Open Access Emerg. Med. 2012*).

Origen del VP exsudat	Causa del VP
Parapneumònic	Infecció pulmonar (pneumònia, abscess pulmonar o bronquièctasi sobreinfectada).
Tuberculós	Infecció pleural pel <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
Maligne derivat d'un tumor primari	Mesotelioma pleural, tumor parenquimatós pulmonar.
Maligne derivat d'una metàstasi pleural	Càncer de pulmó, de mama, d'ovari, gàstric, limfoma.
Malaltia sistèmica	Lupus, artritis reumatoide, dermatomiositis, polimiositis, esclerodèrmia, vasculitis, síndrome de Sjögren.
Malaltia gastrointestinal	Pancreatitis aguda, peritonitis, manipulacions quirúrgiques, perforació esofàgica.
Malaltia cardíaca	Malaltia amb afectació al pericardi, síndrome de Dressler, post-cirurgia de revascularització cardíaca.
Malaltia ginecològica	Endometriosis, síndrome de Meig, VP associat al post-part.
Fàrmac	Reacció a certs fàrmacs com la nitrofurantoïna (antimicrobià), l'amiodarona (antiarrítmic), la clozapina (antipsicòtic), el metotrexat (immunosupressor), entre d'altres.
Hemotòrax	Lesió de la paret toràcica, el diafragma o el parènquima pulmonar, perforació d'un vas sanguini per la inserció d'un catèter, punció per la realització d'una biòpsia pleural.
Quilotòrax	Lesió en el conducte limfàtic.

Malgrat els esforços per determinar el diagnòstic dels VPs, aproximadament el 20% dels casos són d'origen desconegut o difícil de determinar²¹. En aquestes situacions, és preferible optar per un enfoc terapèutic conservador i realitzar el seguiment del pacient²². En altres circumstàncies, és possible que un VP transsudat sigui classificat erròniament com a exsudat segons els criteris Light, sobretot si els pacients prenen diürètics¹³. En aquests casos, la relació entre l'albumina del líquid pleural i la sèrica pot ajudar a obtenir un diagnòstic més acurat d'aquests pacients²³. En el cas que el transsudat sigui un IC, s'ha establert la quantificació del peptid natriurètic cerebral N-terminal (NT-proBNP) com a biomarcador amb una sensibilitat diagnòstica del 94%-99% i una especificitat del 91%-99%^{24,25}. Han i col·laboradors proposen una concentració igual o superior a 1,714 pg/ml com a punt de tall per al diagnòstic procedent de pacients amb IC²⁵.

2.2.2. Tècniques per al diagnòstic del vessament pleural

La detecció i el diagnòstic d'un VP es dur a terme en base a les manifestacions i la història clínica que presenta el pacient, l'exploració física d'aquest, l'anàlisi del líquid pleural i mitjançant tècniques d'imatge. Les manifestacions clíniques varien en funció de l'extensió del VP i la rapidesa amb què s'ha originat. Les més freqüents són la dispnea, el dolor toràcic i la tos seca²⁰. Tot i això, el 15% dels pacients amb VP són asimptomàtics²¹. Conèixer la història clínica del pacient és útil per saber si ha estat exposat a substàncies potencialment tòxiques, com l'asbest, o ha pres certs tipus de fàrmacs associats a la formació d'un VP^{20,26}. De forma complementària, l'exploració física del pacient permet detectar un augment de volum, dificultat al respirar, desviació del mediastí i disminució o absència del soroll associat a la respiració, tots ells signes indicatius d'un possible VP²¹. Un diagnòstic etiològic tardà pot estar associat a major morbiditat i mortalitat.

L'anàlisi del líquid pleural inclou l'estudi bioquímic, citològic i microbiològic. L'extracció del líquid es realitza a través d'una tècnica senzilla i ràpida coneguda com a **toracocentesi**. Consisteix en la inserció d'agulla o catèter connectat a una xeringa de 50 ml en els espais intercostals per tal d'extreure el líquid acumulat a la cavitat pleural aspirant lentament^{27,28}. Aquest procediment presenta una baixa taxa de complicacions i millora la simptomatologia i la qualitat de vida dels pacients.

L'**anàlisi** rutinària del líquid pleural a nivell **bioquímic** inclou la mesura del pH, la determinació dels nivells de glucosa, del contingut proteic, d'albumina, dels enzims LDH i adenosina desaminasa (ADA), i el recompte cel·lular. Els exsudats pleurals presenten nivells elevats de proteïna i LDH mentre que la glucosa està disminuïda²⁹. Els valors de pH pels transsudats sol ser entre 7,45 i 7,55 mentre que pels exsudats sol ser entre 7,30 i 7,45³⁰. Els valors pleurals de LDH reflecteixen grau d'inflamació de la pleura²³. L'augment dels nivells d'aquest enzim en posteriors toracocentesis és indicatiu de que la inflamació pleural persisteix, mentre que si disminueixen és senyal que la inflamació s'ha reduït. El recompte i la composició cel·lular varien en funció de l'etiologia del VP. S'observa un predomini de neutròfils (<50%) quan hi ha un procés pleural agut, mentre que s'observa un predomini de cèl·lules mononuclears quan hi ha un procés pleural crònic^{23,31}.

L'**anàlisi citològica** del líquid pleural sol ser la prova diagnòstica de primera línia quan apareix un VP exsudat. És un mètode econòmic i d'elevada especificitat, tot i això, la sensibilitat és força variable (40-87%) depenent del tumor primari, l'extensió de la malaltia, la preparació de la mostra, la quantitat de mostra obtinguda i l'experiència del citòleg. S'ha reportat una sensibilitat superior per adenocarcinomes en comparació amb mesoteliomes i limfomes^{32,33}. D'altra banda, el **cultiu microbiològic** cal sol·licitar-ho en cas de sospita d'infecció, ja que la freqüència de resultats positius per poblacions amb càncer és molt baix^{34,35}.

La **biòpsia pleural** pot ser necessària en cas que la citologia ofereixi un resultat negatiu o poc precís³⁶. Està indicada en pacients amb sospita de VP derivat d'una malaltia neoplàsica i pot realitzar-se de forma guiada amb l'ajuda de tècniques d'imatge o la toracoscòpia. Tradicionalment, es realitzava sense l'ús d'aquestes tècniques d'imatge (biòpsia a cegues), però avui en dia no sol estar recomanada perquè el rendiment és limitat degut a la distribució no homogènia del tumor a la cavitat pleural³⁷. Cada cop més, es prefereix l'ús de la **toracoscòpia** mèdica perquè permet visualitzar directament tota la superfície pleural i, per tant, maximitza el rendiment diagnòstic de la biòpsia³⁶. És un procediment útil com a prova diagnòstica per a l'avaluació d'un exsudat de causa desconeguda. Al ser tècniques invasives, poden comportar complicacions com dolor, emfisema subcutani i sagnat. La precisió de la tècnica depèn de l'experiència de l'operador i l'observador³⁸.

Avui en dia, es fan servir diverses tècniques d'imatge per diagnosticar el VP. La **radiografia de tòrax** és la tècnica radiològica inicial per confirmar la presència d'un VP²¹, mentre que l'ecografia, la tomografia computeritzada (TC) i la ressonància magnètica són tècniques complementàries útils en l'abordatge posterior. La radiografia de tòrax és l'exploració més

comuna per distingir si un VP és uni o bilateral i detectar possibles complicacions associades a la toracocentesi. En la **figura 2A** es mostra un exemple representatiu d'una radiografia frontal dels pulmons d'un pacient amb VP³⁹.

En els darrers anys, hi ha hagut un interès creixent en l'ús de l'**ecografia toràctica** (en anglès, *ultrasound*) per a l'estudi de pacients amb VP. Aquesta tècnica presenta diverses avantatges: no fa servir radiació, és econòmica, es pot realitzar al costat del llit, repetir-la les vegades que calgui i és útil a l'hora de planificar la toracocentesi o guiar la biòpsia pleural⁴⁰. A més a més, no és invasiva i presenta més sensibilitat que la radiografia, inclús pels VP de poca extensió. Permet distingir entre lesions sòlides i plenes de líquid. Aquesta tècnica facilita la distinció entre exsudats i transsudats²¹. L'aspecte del líquid pleural pot suggerir l'etiologia del VP, tot i que és necessari practicar la toracocentesi per obtenir diagnòstic definitiu a través de l'anàlisi del líquid⁴⁰.

Finalment, una altra tècnica útil per avaluar situacions complexes que no s'han pogut diagnosticar completament amb una simple radiografia o ecografia és la **TC (figura 2B)**. Permet detectar petites quantitats de líquid pleural en estadis inicials de la formació del VP i ajuda a determinar amb més precisió la localització i l'extensió de la patologia pleural. També permet detectar l'afectació dels ganglis limfàtics mediastínic, l'engruiximent pleural, i és útil com a guia per realitzar una biòpsia pleural. Es caracteritza per tenir una elevada especificitat (88-100%) però baixa sensibilitat (22-56%)^{41,42}. Tot i això, no permet distingir entre un mesotelioma pleural maligne i una metàstasi pleural⁹.

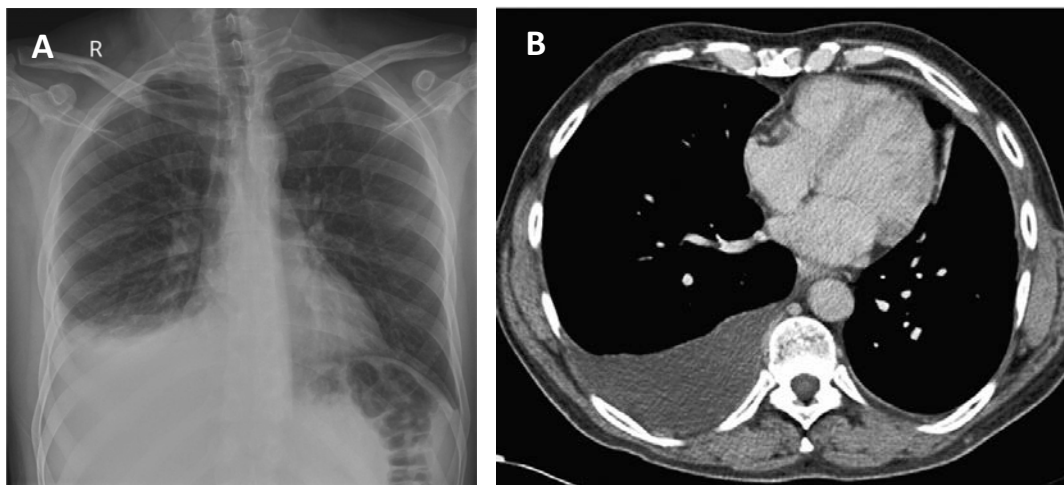


Figura 2. Visualització de la formació d'un vessament pleural per mitjà de dues tècniques d'imatge. (A) Radiografia frontal de tòrax d'un pacient amb vessament pleural on s'observa acumulació de líquid pleural a la part inferior del pulmó esquerre (Imatge obtinguda de *Panjwani, A. Breathe. 2017*). **(B)** Tomografia computeritzada on es detecta l'acumulació de líquid pleural al pulmó dret (adaptada de *Hooper, C. Thorax. 2010*).

El paper de la **ressonància magnètica** en l'estudi del VPM és limitat; pot ajudar a determinar l'afectació de la paret toràcica, la presència de lesions vasculares i de masses mediastíniques. Aquesta tècnica pot ser útil en casos que la TC sigui poc clara. Proporciona informació precisa sobre l'extensió del tumor inclosa la visualització en 3D que facilita la planificació quirúrgica o de radiació⁴³.

2.2.3. Biomarcadors pleurals de diagnòstic

Per tal de poder obtenir un diagnòstic més acurat, es necessita disposar de biomarcadors pleurals precisos complementaris als criteris tradicionals. Durant els darrers anys, s'ha dirigit la recerca clínica cap aquesta direcció. Els biomarcadors tenen un cost reduït, requereixen una mínima invasivitat i ofereixen resultats objectius³⁸. Es poden classificar en 3 grups en funció de si són proteïnes solubles, àcids nucleics o si es detecten per immunocitoquímica (ICC)⁴⁴.

Pel que fa a les **proteïnes solubles**, un exemple paradigmàtic és la mesura de biomarcadors tumorals, com l'antigen carcinoembrionari (CEA) i l'antigen carbohidrat 15-3 (CA 15-3). Diversos estudis suggereixen que podrien estar indicats en casos on hi hagi una forta sospita clínica de malignitat o quan els resultats obtinguts amb la citologia no siguin concloents²⁰. Tanmateix, amb freqüència els punts de tall proposats tenen una elevada especificitat però no arriba a ser absoluta i per tant algun VP benigne podria considerar-se erròniament com a maligne⁴⁴. També s'ha avaluat el poder diagnòstic d'altres proteïnes solubles presents en el VP, com el VEGF i l'endostatina amb sensibilitats de 0,75 i 0,69 i especificitats de 0,72 i 0,78, respectivament. Diversos estudis han demostrat que la precisió diagnòstica de les metal·loproteïnases MMP-1, -2, -3, -7, -8 i -9 i els inhibidors tissulars de les metal·loproteïnases 1 i 2 (TIMP-1 i -2) és molt baixa i que, per tant, el seu paper com a biomarcadors de diagnòstic és molt limitat⁴⁵. Donada la complexitat de la composició del VP és poc probable identificar un únic marcador en el líquid pleural els nivells del qual estiguin relacionats amb una etiologia concreta. És possible que la combinació de diversos biomarcadors permeti assolir nivells elevats de sensibilitat i especificitat diagnòstica.

La determinació de les característiques moleculars i fenotípiques del VPM és cada cop més útil, ja que la recerca s'està dirigint cap a la medicina personalitzada⁴⁴. D'entre els subtipus de VPMs, el mesotelioma és, tradicionalment, el més difícil de diagnosticar donada la baixa sensibilitat de la citologia^{44,46}. Les **tincions ICC** faciliten la distinció del mesotelioma d'altres tumors per la immunoreactivitat que presenten davant de múltiples queratines. En un estudi

recent, que incloïa 258 pacients amb VPM, s'ha observat la pèrdua de la proteïna BAP1 per ICC en el 87% dels que tenien mesotelioma, mentre que en només el 2% dels pacients amb altres carcinomes metastàtics s'observava aquesta pèrdua⁴⁷.

Finalment, s'han identificat diverses **mutacions** útils com a marcadors moleculars associats al desenvolupament del VPM, especialment rellevants en els VPM associats al càncer de pulmó, com són en els gens KRAS, EGFR, MET, BRAF, entre d'altres⁴⁸. Tot i els esforços, no s'ha arribat a un consens clar pel que fa a l'ús de biomarcadors a causa de la falta de validació dels resultats en posteriors estudis. Sovint, la preparació de les mostres, la variabilitat entre les tècniques, i l'ús de cohorts reduïdes han donat lloc a resultats contradictoris³⁷.

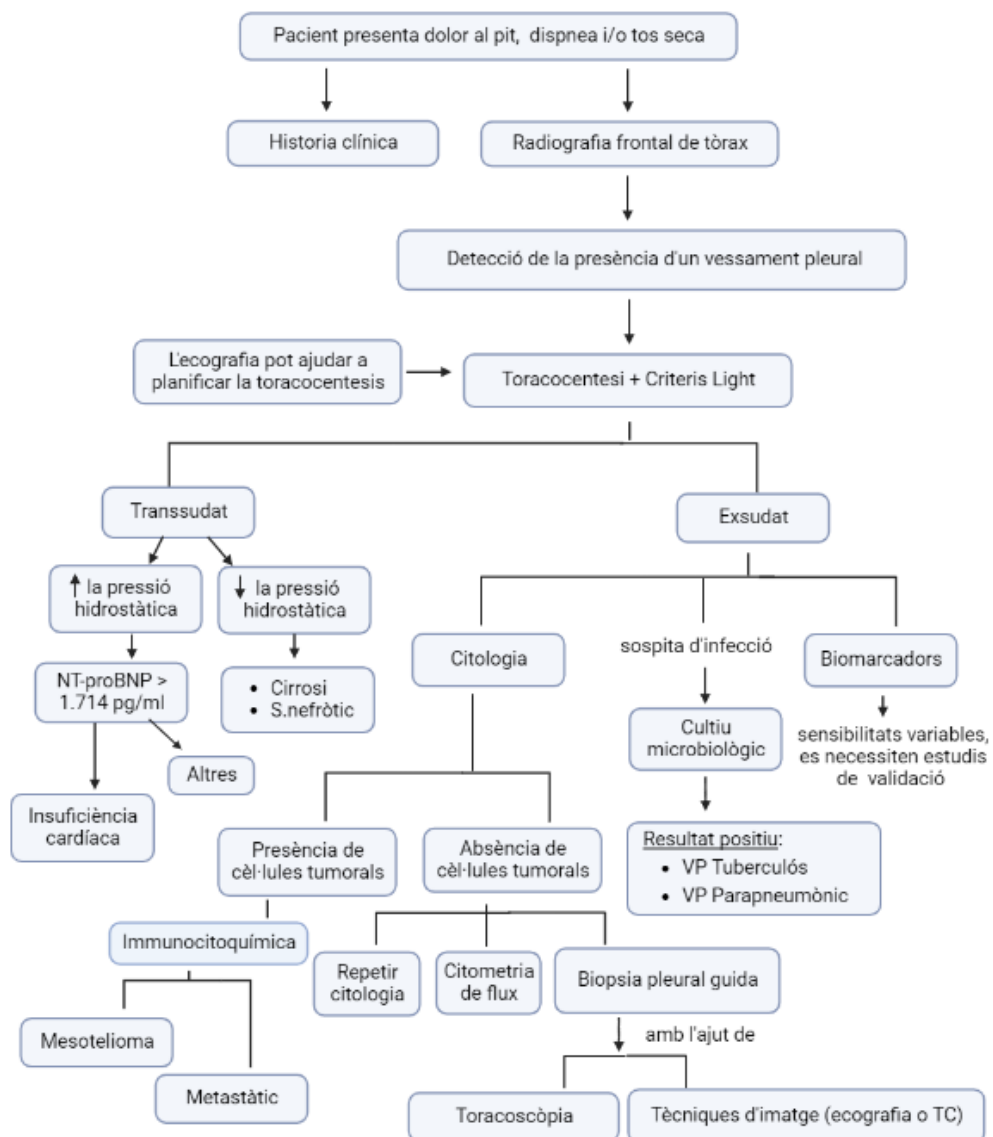


Figura 3. Algorisme general per al diagnòstic d'un vessament pleural (*imatge creada amb Biorender.com*).

2.3. VESSAMENT PLEURAL MALIGNA

El VPM es defineix com l'acumulació significativa d'exsudat pleural acompanyat de cèl·lules malignes o teixit tumoral. És un problema clínic comú en pacients amb càncer i la seva aparició es relaciona amb un mal pronòstic i un empitjorament de la qualitat de vida. La incidència anual de pacients amb VPM als Estats Units es calcula que ronda els 150.000-200.000 casos^{49,50} i s'estima que al Regne Unit estaria al voltant dels 50.000⁵¹. La majoria dels VPMs deriven de metàstasis pleurals, principalment de càncer de pulmó (més d'un terç dels casos)⁵². Histològicament, el càncer de pulmó es classifica en 2 grups: el de cèl·lula petita (CPCP) i el de cèl·lula no petita (CPCNP). Aquest últim compren gairebé el 85% dels casos i al mateix temps es divideix en: adenocarcinoma pulmonar, carcinoma escamós i carcinoma de cèl·lula gran⁵³. En particular, l'adenocarcinoma pulmonar és el principal tipus histològic associat a la formació del VPM, ja que la seva localització perifèrica facilita la invasió de la cavitat pleural. En un estudi realitzat per Porcel i col·laboradors es va determinar que en el 80% dels casos, els VPM es trobaven al mateix costat que el tumor pulmonar primari⁵⁴. Els VPM també s'originen per metàstasis d'altres càncers, en gran part pel de mama, generalment causat per la disseminació directa a través dels vasos limfàtics pleurals⁹. En menor proporció per limfomes, càncer d'ovari i gastrointestinal. El VPM també pot derivar d'un tumor primari al mesoteli pleural, en aquest cas, el pronòstic és més favorable que per la metàstasi pleural del càncer de pulmó. Tot i això, en el 5-10% dels casos no s'identifica el tumor primari⁵⁵. Avui en dia, es desconeixen els motius pels quals alguns tumors causen VPM i altres no. Estudis *post-mortem* han determinat que la invasió dels ganglis limfàtics mediastínic prediu l'aparició d'un VPM³⁷.

Els principals mecanismes associats a la formació del VPM són l'augment de la permeabilitat vascular, freqüentment associat a l'obstrucció del drenatge limfàtic, i la sobreproducció de líquid. En la secció 2.4 s'expliquen en detall els mecanismes cel·lulars i moleculars implicats en la formació del VPM. L'afectació tumoral de la pleura produeix canvis en el mesoteli que poden comportar la descamació i l'engruiximent d'aquest. En termes generals, si el tumor s'implanta a la superfície mesotelial es podran observar cèl·lules malignes en el líquid pleural. En certes ocasions, és possible que pràcticament no es detectin cèl·lules tumorals en el VP i seria indicatiu de que el tumor ha envaït la capa subcerosa de la pleura o que no hi ha hagut afectació directa de la pleura com és el cas del vessament paramaligne.

L'avaluació citològica dels VP es realitza de forma rutinària per detectar la presència de cèl·lules tumorals. Tot i això, a vegades no és possible establir un diagnòstic definitiu únicament amb la citologia, ja que les cèl·lules d'adenocarcinoma es poden confondre amb les

cèl·lules mesotelials reactives i hi poden haver falsos negatius⁵⁶. Això fa que sigui molt complicat diferenciar el VPM associat al mesotelioma del VPM del adenocarcinoma metastàtic. Per tant, hi ha la necessitat de disposar de mètodes complementaris per identificar les cèl·lules tumorals en els VPM. Una possible alternativa és l'anàlisi histopatològica mesurant biomarcadors immunohistoquímics^{57,58}. Una altra bona candidata a l'hora d'establir el diagnòstic del VPM és la **citometria de flux** perquè permet quantificar un gran nombre de poblacions cel·lulars amb poc volum de líquid pleural. També permet mesurar la quantitat de DNA i el cicle cel·lular de les poblacions presents en el líquid⁵⁹. Tot i que no sigui una tècnica que s'apliqui de forma rutinària, el seu ús està acceptat, ja que permet resoldre certes limitacions de la citologia pleural i confirmar el diagnòstic maligne en casos dubtosos^{60,61}. És un mètode ràpid, precís i fàcilment reproduïble i és el que hem aplicat en aquest treball per quantificar les cèl·lules malignes presents en els VPs inclosos en els articles.

2.3.1. Pronòstic dels pacients amb vessament pleural maligne

La supervivència mitjana global dels pacients amb VPM es troba entre els 3 i 12 mesos segons les característiques del tumor, l'extensió de la patologia, l'estat funcional del pacient. Els VPM derivats de càncer de pulmó i gastrointestinal són els que presenten un pitjor pronòstic⁶². La composició molecular i cel·lular del líquid pot aportar informació sobre l'esperança de vida d'aquests pacients. Cada cop es dona més importància a l'alentiment de la progressió de la malaltia mitjançant la millora dels factors de risc. Predir l'expectativa de supervivència d'un pacient amb VPM pot facilitar la selecció del tractament terapèutic més adient. S'han desenvolupat i validat diversos sistemes de puntuació per predir la supervivència dels pacients amb VPM⁶³.

La **puntuació LENT** és la primera puntuació de pronòstic validada pel VPM. Té en compte els nivells de LDH del líquid pleural, la puntuació *Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status* (EGOG PS), la proporció neutròfil/limfòcit en sang (NLR) i el tipus de tumor⁶⁴. La puntuació total es calcula a partir del valor numèric associat a cada indicador pronòstic i permet classificar els pacients segons el risc de mortalitat en baix, moderat i alt^{64,65}. Breument, la puntuació ECOG PS estratifica els pacients en 6 graus segons l'estat del malalt tal com es mostra en la **taula 3**. Hi ha evidències que recolzen que la puntuació LENT té un poder predictiu superior per la supervivència a curt termini que la puntuació ECOG per si sola, ja que és menys subjectiva i engloba proves de fàcil accés sense costos afegits⁶⁴. Tot i això, s'ha observat que la puntuació LENT subestima la supervivència dels pacients amb VPM derivat

d'adenocarcinoma pulmonar, en particular, aquells que tenen la mutació EGFR. En aquests casos, Abisheganden i col·laboradors van proposar una modificació del model LENT⁶⁶.

Taula 3. Estat dels pacients amb diferents graus de ECOG PS (Zamboni, M.M. *BMC Pulm. Med.* 2015).

Grau ECOG PS	Estat del pacient
0	Totalment actiu, capaç de realitzar les tasques del dia a dia sense que la malaltia el limiti.
1	Ambulatori i capaç de realitzar tasques lleugeres o sedentàries com feines domèstiques o d'oficina però amb dificultats per realitzar activitats físicament extenuants.
2	Ambulatori i capaç de cuidar-se per si mateix, però sense poder realitzar cap activitat laboral més de la meitat del dia.
3	Capaç de cuidar-se per si mateix amb certes limitacions, es troba en repòs en una cadira o al llit més de la meitat del dia.
4	Incapaç de cuidar-se per si mateix. Completament inhabilitat, confinat al llit o en una cadira.
5	Mort

L'any 2018, es va desenvolupar la **puntuació PROMISE** que avalua la supervivència dels pacients amb VPM al cap de 3 mesos combinant paràmetres clínics, com els nivells d'hemoglobina, PCR, recompte de leucòcits, l'ECOG PS, el tipus de càncer, amb un paràmetre biològic: la concentració de l'inhibidor tissular de la metal·loproteïnasa-1 (TIMP-1)⁶⁷. Cal tenir present que aquests models són útils a l'hora de proporcionar una orientació sobre l'esperança de vida dels pacients amb VPM. Tot i això, avui en dia, no aporten la suficient precisió per establir estratègies de tractament individualitzades i s'han d'anar adaptant a les noves opcions terapèutiques que van apareixent⁶⁸.

Recentment, s'ha proposat un nou model de pronòstic conegut com a **SELECT**, que inclou les mutacions de EGFR i que ha estat més eficaç que el LENT a l'hora de predir la supervivència al cap de 90 dies en poblacions asiàtiques amb VPM. Aquest model té en compte el sexe, la puntuació ECOG PS, el recompte de leucòcits, la mutació EGFR, la quimioteràpia i el tipus de tumor primari. Es necessiten estudis posteriors que validin la precisió d'aquest model⁶⁹.

2.3.2. Biomarcadors pleurals de pronòstic

Algunes variables bioquímiques obtingudes durant el seguiment clínic s'han associat a un mal pronòstic en pacients amb VPM; com és el cas del pH inferior a 7,2 o dels nivells baixos de glucosa que suggereixen una esperança de vida reduïda i una major probabilitat que la

pleurodesi sigui inefectiva^{29,70}. Diversos estudis proposen que els nivells pleurals de certs factors solubles podrien aportar informació sobre el pronòstic dels pacients amb VPM. En són exemples el VEGF, la survivina, el CD40 soluble, i la IL-17. La determinació de la concentració pleural de VEGF no només ajudaria a diagnosticar el VPM derivat de mesotelioma, sinó que la seva expressió es relaciona amb un pronòstic desfavorable^{71,72}. En un altre estudi, nivells pleurals elevats de survivina, un membre de la família d'inhibidors de l'apoptosi, s'associaven amb un mal pronòstic en pacients amb VPM d'etiologies diverses⁷³. Finalment, nivells pleurals elevats de IL-17 i de CD40 soluble, un potencial modulador de les respostes antitumorals, s'associaven de manera independent amb un estat avançat del càncer i un mal pronòstic en pacients amb VPM derivat de càncer de pulmó^{74,75}. Aquests avenços demostren l'interès creixent per identificar biomarcadors que puguin per si sols, o de forma combinada, predir, amb suficient precisió, l'esperança de vida dels pacients amb VPM.

2.3.3. Tractaments pel vessament pleural maligne

Els tractaments estàndard pel VPM són en gran mesura pal·liatius, tracten d'evitar la re-accumulació del líquid pleural i alleugerir els símptomes del VPM. L'elecció del tractament més adequat ve determinada per diversos factors: simptomatologia i estat funcional del pacient, esperança de vida, el risc quirúrgic, el tipus de tumor primari, resposta a la teràpia sistèmica i grau d'expansió pulmonar⁶². Progressivament, s'han anat substituint els procediments més agressius realitzats per cirurgians toràcics per tècniques mínimament invasives realitzades per metges respiratoris³⁷. La Societat Toràcica Americana va definir la primera guia per al maneig del VPM i, anys més tard, la Societat Toràcica Britànica va fer un recull actualitzat de les pautes a seguir per a tractar els VPMs⁷⁶.

Un dels tractaments de primera línia pel VPM simptomàtic és la **toracocentesi terapèutica**, ja que permet drenar un gran volum de líquid pleural de forma simple i controlada⁶². Una complicació mecànica associada al VPM o al drenatge del líquid pleural és la incapacitat del pulmó per expandir-se cap a la cavitat toràcica (pulmó no-expansible)⁷⁷. La toracocentesi no es considera un procediment definitiu perquè, tot i que acostuma a anar associat a una millora de la dispnea, la incidència de reaparició del VP es troba al voltant del 96% 30 dies després d'haver realitzat aquesta tècnica^{9,78}. Es recomana practicar toracocentesis repetides, sobretot en pacients que presentin VPM recurrent i una esperança de vida igual o inferior a un mes. També se'ls pot donar opioides o broncodilatadors per alleugerir la simptomatologia associada

al VPM. Així s'evita l'hospitalització de pacients amb una esperança de vida reduïda i un estat funcional deficient⁶².

Un altre dels tractaments que s'utilitzen habitualment és la **pleurodesi química**. Aquesta tècnica es basa en la instil·lació de substàncies irritants com la tetraciclina, la doxiciclina, la bleomicina (antibiòtics) o el talc a la cavitat pleural per tal d'estimular la inflamació local, promoure l'adherència de la pleural parietal i visceral, i prevenir la reacumulació de líquid⁷⁸. S'ha demostrat que l'eficàcia del talc en el control del VPM és superior a la dels altres agents⁷⁹. No obstant això, existeixen dubtes sobre la seguretat del talc, ja que s'han reportat casos amb efectes adversos sistèmics després de l'administració intrapleural d'aquest compost. Alguns d'aquests efectes inclouen l'alliberació de mediadors proinflamatoris i de coagulació en resposta a un agent irritant⁸⁰. En certs casos, s'ha produït la mort durant el primer mes després de la pleurodesi⁵⁵.

Una altra opció de tractament que ha guanyat protagonisme en l'última dècada és el drenatge del líquid a través de **catèters intrapleurals permanents** (CIP). Es tracta de la col·locació d'un catèter connectat a una ampolla on s'acumularà el drenatge pleural. L'avantatge d'aquesta tècnica és que es pot realitzar a l'ambulatori o a casa, fet que minimitza els costos associats a l'estada hospitalària. El líquid pleural es drena en intervals de 24 a 48 h⁵⁰. Es recomana en casos on no hi ha reexpansió pulmonar. En un estudi multicèntric aleatoritzat es va observar que els pacients amb VPM tractats amb CIP van tenir un temps d'hospitalització més curt que els tractats amb talc, però no es van observar diferències pel que fa a la simptomatologia i el temps de supervivència⁸¹. A vegades, poden presentar complicacions com infeccions o propi trencament, desplaçament o obstrucció del catèter. En un estudi recent s'ha testat l'eficàcia de l'administració de talc per mitjà d'un CIP, és a dir, la combinació de les dues últimes tècniques terapèutiques. Els resultats van mostrar que un 43% dels pacients que van rebre talc van obtenir una pleurodesi exitosa enfront un 23% que no se'ls va administrar talc⁸².

Una altra opció viable per aquells pacients que no presentin quimioresistència és la **quimioteràpia** dirigida a la reducció de la mida del tumor i a l'absorció del líquid pleural. Avui en dia, la quimioteràpia intrapleural no es fa servir com a monoteràpia, sinó que es combina amb altres estratègies de tractament⁷⁸. Els agents quimioterapèutics més comuns són el cisplatí, la doxorubicina i la mitomicina C⁸³.

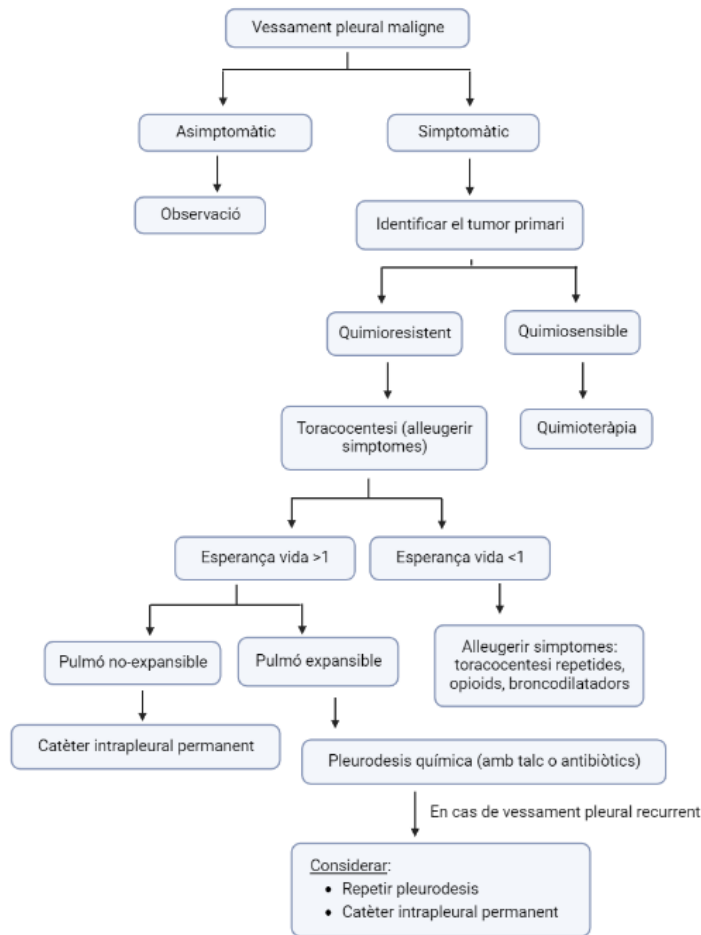


Figura 4. Algoritme proposat per al tractament d'un vessament pleural maligne (imatge creada amb Biorender.com).

En funció de l'origen del tumor primari associat al VPM es recomana un tractament o un altre. En el cas del càncer de pulmó hi ha divergències en funció de la histologia del tumor. En pacients amb CPCP el tractament escollit és la quimioteràpia. En canvi, en pacients amb CPNCP avançat e inoperable s'ha de considerar la pleurodesi amb talc⁵⁵. Lin i col·laboradors van testar l'eficàcia combinada dels inhibidors tirosina quinasa del EGFR (EGFR-TKI) amb la pleurodesi amb talc en pacients amb VPM derivat de CPNCP que presentaven la mutació EGFR⁸⁴. L'estratègia de tractament seqüencial va millorar la supervivència dels pacients respecte als que només van rebre l'EGFR-TKI i obre les portes a seguir la recerca clínica cap a nous tractaments combinats⁸⁴. Pel càncer de mama i els càncers hematopoètics, la quimioteràpia pot ser efectiva. En cas que la quimioteràpia falli, la pleurodesi amb talc pot ser una alternativa efectiva⁵⁵. En termes generals, la col·locació d'un CIP amb o sense administració de talc i drenatge diari continua sent la teràpia preferida pels VPM amb pulmó no-expansible⁸³.

2.4. FORMACIÓ DEL VESSAMENT PLEURAL MALIGNE

Inicialment, es va creure que el mecanisme principal associat a l'aparició del VPM era l'alteració del drenatge limfàtic de la pleura parietal, secundària a la invasió tumoral. Els darrers anys, s'ha qüestionat que aquesta sigui la via principal de formació del VPM per diverses raons. En primer lloc, la velocitat d'acumulació de líquid pleural en el context maligne és més alta de la que s'esperaria si es produís simplement per la obstrucció del drenatge limfàtic. En segon lloc, en la majoria de VPMs, la concentració de proteïnes és superior a la del líquid pleural d'un individu sà suggerint que hi ha una fuga de plasma. Finalment, l'aparició del VPM té lloc inclús en pacients que no tenen afectació de la pleura parietal³⁷. Així doncs, la formació del VPM és el resultat de l'acció conjunta de diversos mecanismes coordinats entre si, no només la obstrucció limfàtica sinó també l'augment de la permeabilitat vascular i la sobreproducció de líquid pleural.

En aquest context, té lloc una complexa interacció tumor-hoste que desencadena la inflamació pleural, l'angiogènesi tumoral i l'augment de la permeabilitat vascular⁸⁵. Les cèl·lules tumorals fan metàstasi cap a la cavitat pleural principalment a través del torrent sanguini, generalment envaint la pleura visceral i establint-hi un focus de proliferació^{86,87}. La disseminació secundària cap a la pleura parietal té lloc quan les cèl·lules tumorals es desprenen del focus de proliferació i romanen en suspensió en el propi líquid³⁷. És fàcil pensar que les cèl·lules tumorals flotants es tornen susceptibles a la mort cel·lular perquè es veuen privades dels nutrients que arribaven a través dels vasos sanguinis. Curiosament, aquestes cèl·lules malignes no només sobreviuen, sinó que proliferen i s'estenen per la cavitat pleural. Això ens podria indicar que, d'una banda, les cèl·lules tumorals experimenten canvis metabòlics per adaptar-se al microambient tumoral i/o que, d'altra banda, fan servir vies alternatives d'obtenir energia³⁷. És molt probable que el mateix contingut del VPM sigui ric en nutrients i factors estimuladors de la supervivència de les cèl·lules tumorals facilitant la formació de focus secundaris en teixits subpleurals de l'hoste⁸⁸. S'ha descrit que factors de creixement, com el TGF- β , el factor de creixement epidèrmic (EGF) i els factors de creixement insulínics 1 i 2 (IGF-1 i IGF-2, de l'anglès *insulin-like growth factor*) promouen la supervivència de les cèl·lules tumorals⁸⁹. La plaqueta i els seus derivats juntament amb diversos components del sistema de coagulació també afavoreixen la supervivència del tumor⁹⁰.

Segons sembla, no hi ha una única via de metàstasi cap a la cavitat pleural. A banda de la mencionada, també pot ser envaïda per la disseminació a través del sistema limfàtic dels

pulmons o per l'afectació tumoral directa d'estructures contigües a la cavitat pleural com el diafragma, la paret toràctica o el mediastí⁹¹.

Les cèl·lules tumorals del VPM coexisteixen amb una multitud de cèl·lules de l'hoste inclòs les cèl·lules endotelials, mesotelials i els leucòcits⁸⁵. Un ampli repertori de citocines i quimiocines derivades dels mecanismes inflamatoris i les interaccions cel·lulars estan involucrades en la formació del VPM. Inicialment, el mesoteli pleural es considerava una membrana semipermeable sense un paper actiu en els processos patològics pleurals. Amb els anys, s'ha vist que la cèl·lula mesotelial és metabòlicament activa i pot sintetitzar un ampli repertori de factors en resposta a diversos estímuls, des de proteïnes de la MEC, com el col·lagen i l'elastina, factors de creixement i citocines^{13,92}. Aquestes cèl·lules són responsables de l'inici de la resposta inflamatòria orquestrant el reclutament de neutròfils i cèl·lules mononucleades a través de la secreció de IL-8 i la proteïna quimioattractant de monòcits 1 (MCP-1)^{93,94}. Els limfòcits T reguladors (Tregs) són reclutats a l'espai pleural per la quimiocina CCL22, produïda principalment pels macròfags i les cèl·lules tumorals^{95,96}. Els limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺ i els B són atrets pel CXCL10⁹⁷, produïda per cèl·lules presentadores d'antígens (macròfags i cèl·lules dendrítiques) i cèl·lules tumorals^{98,99}. La migració dels neutròfils cap a la cavitat pleural té lloc sota la influència de la IL-8¹⁰⁰, el leucotriè B4 (LTB4)¹⁰¹ i el ENA-78 (de l'anglès, *epithelial neutrophil-activating peptide-78*)¹⁰². A més a més, les cèl·lules mesotelials també expressen molècules d'adhesió a la seva superfície, com la molècula d'adhesió intracel·lular 1 (ICAM-1) i la molècula d'adhesió vascular 1 (VCAM-1), que faciliten la migració de les cèl·lules fagocítiques a través dels espais intracel·lulars¹⁰³. Finalment, models experimentals han demostrat que la IL-5 també està implicada en la formació del VPM, ja que facilita l'entrada d'eosinòfils i cèl·lules supressores d'origen mieloide (MDSCs)¹⁰⁴.

A la cavitat pleural, els leucòcits atrets s'acumulen localment i modulen la proliferació de les cèl·lules tumorals i la permeabilitat vascular. Hi ha evidències que suggereixen que els macròfags pleurals també participen en l'inici de la resposta inflamatòria en el VPM. La seva posició els converteix en un dels primers leucòcits en interaccionar amb les cèl·lules tumorals a nivell pleural. Secreten diverses molècules immunomoduladores com el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el TGF- β , el factor de creixement endotelial vascular (VEGF) i l'osteopontin (OPN), que també contribueixen a augmentar la permeabilitat vascular, indueixen la formació de nous vasos sanguinis i promouen la supervivència de les cèl·lules tumorals. També són una font important de IL-6, una citocina pleiotròpica que promou el creixement tumoral, entre d'altres funcions⁸⁵. Recentment, s'ha vist que els mastòcits també participen en la formació del VPM, alliberant mediadors inflamatoris com la IL-1 β que

desencadenen l'activació de vies de senyalització que fomenten l'acumulació de líquid i el creixement tumoral. El nombre de mastòcits/ μl en VPMs és superior al dels VPBs derivats de pacients amb IC. La migració dels mastòcits cap a la cavitat pleural en pacients amb VPM derivat d'adenocarcinoma té lloc a través d'un gradient de CCL12¹⁰⁵.

Paral·lelament, les cèl·lules tumorals del VPM secreten quimiocines i citocines que també contribueixen al reclutament de cèl·lules immunomoduladores com els macròfags, els limfòcits Tregs i les MDSCs afavorint el creixement tumoral. D'entre les molècules secretades per les cèl·lules tumorals en destaquen el VEGF, el TGF- β i l'OPN que n'estimulen la seva pròpia proliferació, migració i potencial d'invasió³⁷. També alliberen micropartícules que recluten plaquetes com aliades promovent la seva activació i agregació i l'alliberació de factors proangiogènics¹⁰⁶. En la **figura 5** es mostra un esquema de les interaccions entre les molècules i les cèl·lules necessàries per al reclutament de les cèl·lules del sistema immunitari implicades en la formació del VPM.

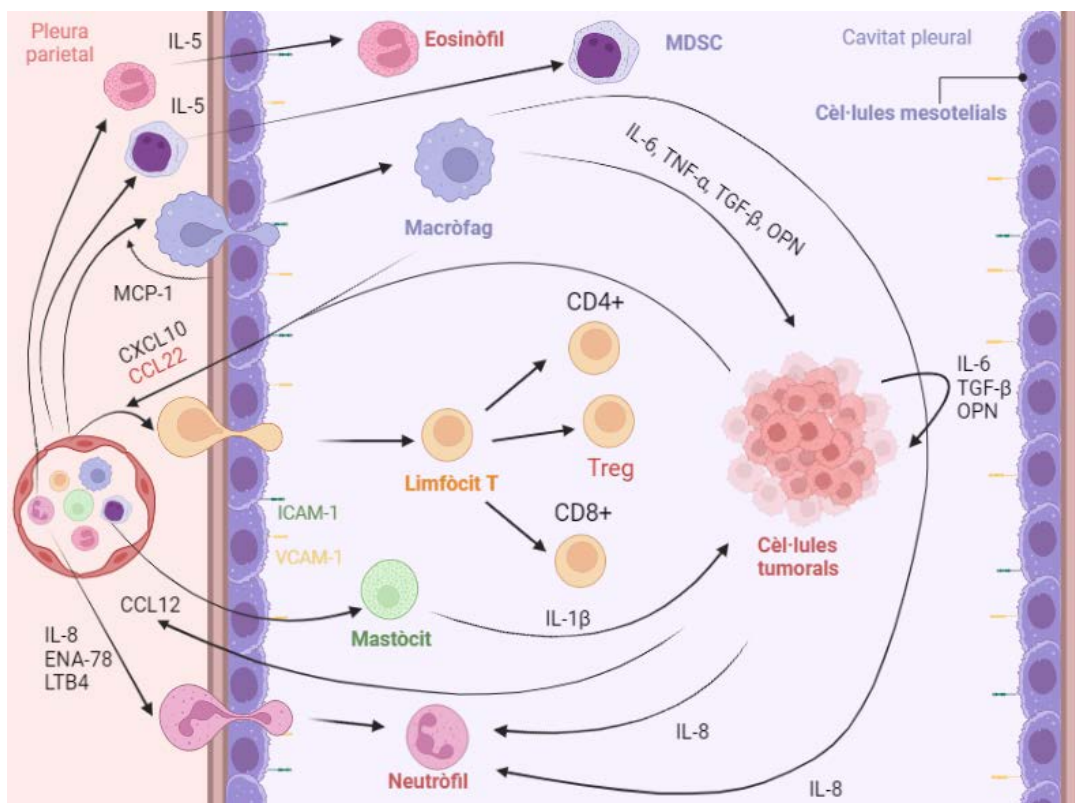


Figura 5. Interaccions moleculars entre cèl·lules implicades en la formació del vessament pleural maligne. Es mostren les quimiocines que modulen el reclutament de les cèl·lules del sistema immunitari cap a la cavitat pleural i els factors que augmenten la permeabilitat vascular i promouen el creixement tumoral (*imatge creada amb Biorender.com*).

2.5. EL SISTEMA IMMUNITARI EN EL MICROAMBIENT TUMORAL DEL VESSAMENT PLEURAL MALIGNNE

El microambient tumoral és l'entorn format per diverses poblacions cel·lulars, mediadors inflamatoris, molècules de senyalització i components de la MEC que condicionen el desenvolupament tumoral i la metàstasi. Les interaccions entre les cèl·lules malignes i les cèl·lules de l'hoste són dinàmiques i bidireccionals i es produeixen per contacte directe cèl·lula-cèl·lula o a través de mediadors solubles, entre els quals hi trobem citocines, quimiocines, factors de creixement, vesícules extracel·lulars, exosomes, DNA lliure i cossos apoptòtics¹⁰⁷.

Avui en dia, tot i els avenços en el maneig diagnòstic i terapèutic dels VPM, els mecanismes cel·lulars i moleculars implicats en la patogènia de la inflamació pleural requereixen ser estudiats amb més detall. El paper del sistema immunitari en el microambient tumoral ha esdevingut una àrea d'interès creixent en els darrers anys, fins al punt que diverses estratègies terapèutiques estan dirigides contra les cèl·lules del sistema immunitari i les molècules derivades d'aquestes.

2.5.1. Sistema immunitari innat

El sistema immunitari innat és la primera línia de defensa davant de microorganismes patògens, substàncies estranyes i cèl·lules malignes. S'encarrega de generar una resposta inflamatòria ràpida i d'activar el sistema immunitari adaptatiu a través del contacte directe o, indirectament, a través de l'alliberació de mediadors solubles. Les principals cèl·lules que conformen el sistema immunitari innat són els monòcits, els macròfags, les cèl·lules dendrítiques, els mastòcits, els granulòcits (neutròfils, eosinòfils i basòfils) i les cèl·lules *natural killer* (NK). Les plaquetes i el complement, tot i no ser considerades cèl·lules, també són components essencials de la resposta innata¹⁰⁸. El complement està constituït per una àmplia varietat de proteïnes del plasma¹⁰⁹.

En els darrers anys, s'ha descobert poblacions que presenten característiques tant del sistema immunitari innat com de l'adaptatiu. Es tracta de les cèl·lules limfoides innates (ILCs, de l'anglès *innate lymphoid cells*) i les cèl·lules T no-convencionals, que inclou les cèl·lules NKT i les $\gamma\delta$ -T¹¹⁰. Participen en l'homeòstasi pulmonar i estan adquirint un paper rellevant en

malalties pulmonars. Les cèl·lules T no-convencionals presenten receptors específics d'antígens semivariants que reconeixen lípids, metabòlits i pèptids modificats^{110,111}.

La resposta immune innata s'inicia amb el reconeixement de molècules pròpies de patògens o senyals de dany tissular per un conjunt fix de receptors coneguts com a PRR (de l'anglès, *pattern recognition receptors*)¹¹². Existeixen diversos tipus de PRR que poden trobar-se associats a compartiments subcel·lulars, com els endosomes, en el citosol o expressar-se a la superfície de la cèl·lula innata¹¹³. Una família important de PRR és la dels TLRs (de l'anglès, *toll-like receptors*). Aquests receptors activen mecanismes necessaris per resoldre la infecció o el dany com són la fagocitosi, alliberació de ROS i RNS (de l'anglès, *reactive nitrogen species*) i la secreció de citocines proinflamàtòries. Les cèl·lules presentadores d'antígens, particularment els macròfags i les cèl·lules dendrítiques, s'encarreguen d'activar les cèl·lules del sistema immunitari adaptatiu presentant-los els antígens estranys en les molècules del complex principal d'histocompatibilitat (MHC, de l'anglès, *major histocompatibility complex*)¹¹⁴.

En les darreres dècades, s'ha prestat especial atenció al paper dual del sistema immunitari innat en la progressió del càncer. Pel que fa a als mecanismes antitumorals, les cèl·lules NK destrueixen el tumor a través de l'alliberació d'enzims citotòxics, la inducció d'apoptosi a través de receptors de mort (liligand fas o TRAIL, de l'anglès, *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) i la producció d'IFN- γ ¹¹⁵. En el VPM, aquestes cèl·lules mostren una capacitat citotòxica reduïda¹¹⁶. De forma similar, les cèl·lules $\gamma\delta$ -T són capaces de destruir les cèl·lules tumorals induint-los la lisi directa o secretant un ampli ventall de citocines, entre les quals es troba l'IFN- γ ¹¹⁷. Les cèl·lules presentadores d'antígens, al seu torn, presenten antígens tumorals als limfòcits T citotòxics i els activen per a què eliminin les cèl·lules tumorals¹¹⁸. A més a més, les cèl·lules del sistema immunitari innat secreten quimiocines i citocines proinflamàtòries per reclutar les cèl·lules del sistema adaptatiu^{119,120}. Pel que fa als mecanismes protumorals, evidències recents han demostrat l'existència de subtipus de cèl·lules dendrítiques amb propietats immunosupressores que contribuirien a la progressió tumoral^{121,122}. Les ILCs poden actuar promovent o limitant el creixement maligne en funció dels factors solubles del microambient tumoral¹²³. Paral·lelament, les cèl·lules tumorals, secreten factors solubles que contribueixen a la diferenciació de macròfags i neutròfils cap a un fenotip protumoral.

A continuació, s'expliquen en detall les característiques i funcions dels monòcits/macròfags, els neutròfils i les plaquetes en condicions fisiològiques i en el microambient tumoral, centrant especial atenció en la seva rellevància en el VPM.

2.5.1.1. Monòcits i macròfags

Monòcits

Els monòcits són cèl·lules circulants en la sang perifèrica que pertanyen al grup de fagòcits mononuclears. Constitueixen el 10% del total de leucòcits en individus sans, però poden augmentar considerablement en nombre en situacions d'estrès, infeccions o exercici¹²⁴. S'originen a la medul·la òssia a partir d'un precursor mioide, seguidament, són alliberats al torrent sanguini i migren cap als teixits on continuaran el seu procés de maduració fins a originar macròfags i cèl·lules dendrítiques. La vida mitjana dels monòcits en sang és d'entre 1-2 dies, si en aquest període no han entrat als teixits, moren, i són eliminats de la sang¹²⁵. Morfològicament, els monòcits es caracteritzen per tenir un gran nucli, vesícules citoplasmàtiques i lisosomes. Amb els anys s'ha observat que no són una població tan homogènia com es creia inicialment, sinó que se'n poden distingir diversos tipus (monòcits clàssics, intermedis i no-clàssics) en funció de l'expressió del CD16 i el CD14¹²⁴. Els monòcits clàssics (CD14^{hi} CD16⁻) representen gairebé el 90% del total de monòcits, mentre que els monòcits intermedis (CD14^{+/hi} CD16⁺) i els no clàssics (CD14⁻ CD16^{+/hi}) constitueixen el 10% restant¹²⁶. L'àmplia varietat de receptors expressats a la seva superfície els converteix en cèl·lules clau durant l'activació de la resposta immunitària innata. Contribueixen al manteniment de l'homeòstasi tissular i la immunitat antimicrobiana a través de diverses funcions, incloses la fagocitosi i la secreció de citocines. La diferenciació de monòcits a macròfags està principalment dirigida per factors de creixement de la família CSF (de l'anglès, *Colony Stimulating Factors*)¹²⁷.

En condicions d'inflamació associada al càncer, els monòcits disposen de la maquinària per destruir directament les cèl·lules tumorals a través del contacte directe o de l'alliberació de mediadors proinflamatoris. Per altra banda, poden tenir funcions protumorals contribuint al reclutament de cèl·lules immunosupressores, promovent l'angiogènesi i la metastasi¹²⁸. En cas que la metastasi tingui lloc a la cavitat pleural, hi ha evidències de l'acumulació de monòcits no-clàssics en pacients amb VPM en comparació amb pacients amb VP transsudat. Els monòcits no-clàssics presenten una elevada expressió de CCR2, CX3CR1 i IL-1 β en comparació amb els monòcits clàssics. Alguns autors proposen que els monòcits no-clàssics estarien contribuint a la formació del VPM a través de la secreció de IL-1 β ¹²⁹. Un estudi recent mostra que les freqüències de monòcits intermedis i no clàssics en els VPs faciliten la discriminació entre el VPM i el VP tuberculós¹³⁰.

Macròfags

Els macròfags estan involucrats en l'inici i la regulació de les respostes del sistema immunitari adaptatiu a través de la presentació d'antígens a la seva superfície i la producció de mediadors inflamatoris, ROS, factors quimiotàctics i metal·loproteïnases. També participen en la remodelació i reparació tissular, així com la fagocitosis d'agents infecciosos. Presenten una elevada heterogeneïtat fenotípica i funcional condicionada en gran part pels estímuls que reben del microambient on es troben. Tradicionalment, es classifiquen en 2 grups principals: els macròfags M1 (proinflamatoris o clàssics) i M2 (antiinflamatoris o alternatius) que difereixen en fenotip i funció. Els macròfags M1 presenten una elevada capacitat bactericida, propietats antitumorals i es caracteritzen per una elevada expressió de molècules relacionades amb la presentació antigènica com HLA-DR, CD80, CD86. També produeixen citocines proinflamatòries com el TNF- α , la IL-1 β i la IL-6, així com ROS i RNS. Els macròfags M2, en canvi, participen en processos antiinflamatoris i de reparació tissular i es caracteritzen per l'expressió de CD163 i CD206 i la secreció molècules immunosupressores com la IL-10 i el TGF- β ^{131,132}. Els macròfags associats al tumor (TAMS, de l'anglès, *tumor-associated macrophages*) acostumen a presentar característiques típiques de macròfags M2¹³¹. A més a més, també secreten mediadors inflamatoris, com la prostaglandina E2 i VEGF, i metal·loproteïnases, com la MMP-9, que estimulen l'angiogènesi, el creixement tumoral i la metàstasi¹³³.

A nivell pulmonar, es poden distingir principalment 3 poblacions de macròfags segons la seva localització. D'una banda, els macròfags alveolars que resideixen a les vies aèries del pulmó i s'encarreguen principalment d'eliminar les cèl·lules apoptòtiques de l'entorn respiratori, limitar la resposta immunitària adaptativa i regular el reclutament de neutròfils i monòcits cap al pulmó¹³⁴. D'altra banda, els macròfags intersticials, que es troben a l'espai intersticial entre els alvèols i els vasos sanguinis, i participen en la remodelació tissular i actuen com a barrera immunitària¹³⁵. Finalment, els macròfags pleurals, que com el seu nom indica habiten a la cavitat pleural i contribueixen en el manteniment de l'homeòstasi de la cavitat pleural fagocitant les cèl·lules mesotelials degenerades¹³⁶.

El paper dels macròfags és clau en qualsevol resposta inflamatòria. En particular, en el context del VPM, els TAMs afavoreixen el creixement del tumor a través de diferents mecanismes. D'una banda, presenten una capacitat citotòxica reduïda davant les cèl·lules tumorals; secreten factors que les protegeixen de l'apoptosi i promouen l'angiogènesi a través de la secreció de VEGF i altres molècules proangiogèniques⁷⁸. D'altra banda, redueixen l'activació dels limfòcits T mitjançant de la secreció del TGF- β ¹³⁷ i possiblement a través de la interacció

entre el PD-L1 que expressen en superfície i el PD-1 dels limfòcits T^{138,139}. Fenotípicament, s'ha descrit que els macròfags pleurals mostren una alta densitat de molècules HLA-DR i ICAM-1 que els atorga una major capacitat per presentar antígens¹⁴⁰. Un estudi recent, on s'ha aplicat la metodologia de *single-cell*, ha estat capaç de diferenciar 3 subpoblacions de macròfags en el VPM amb un predomini de marcadors característics del fenotip M2 protumoral¹⁴¹. Per altra banda, Wu i col·laboradors han observat una elevada heterogeneïtat entre els macròfags del VPM dels pacients amb càncer de pulmó amb un ampli espectre de patrons d'expressió de marcadors M1/M2. Convé destacar que aquests autors van identificar una nova població de macròfags que presenta característiques tant de M1 (HLA-DR i IL-1 β) com de M2 (CD163 i TGF- β) i baixa expressió de PD-L1. Així mateix, van descobrir que l'administració conjunta d'IFN- γ i β -glucagó aconseguia repolaritzar els macròfags pleurals cap a un fenotip antitumoral M1 (figura 6)¹³⁹.

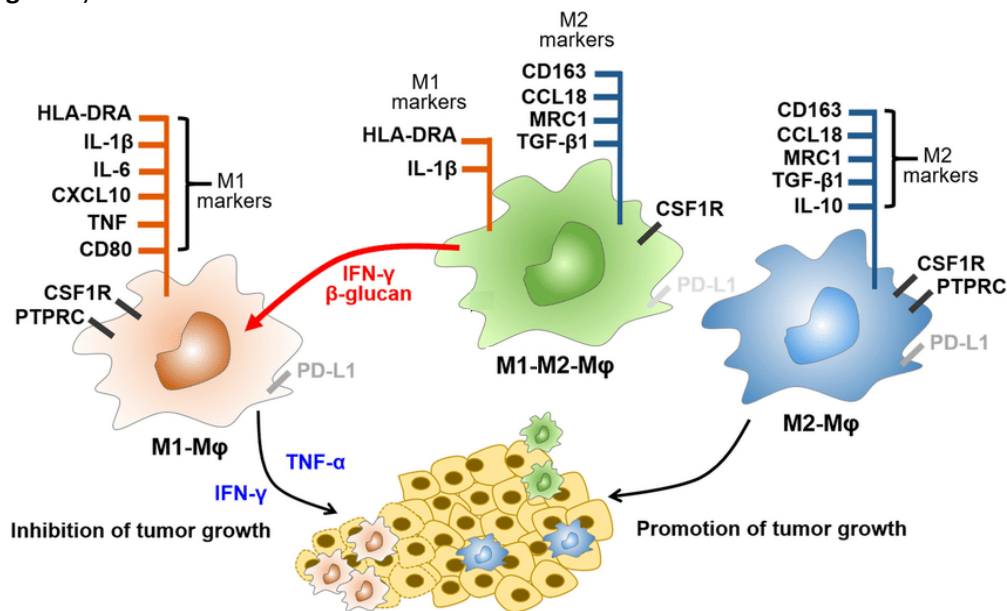


Figura 6. Característiques fenotípiques de les subpoblacions de macròfags presents en el vessament pleural maligne. En el microambient tumoral del VPM es diferencien 3 tipus de macròfags, els clàssics M1, els alternatius M2 i una tercera població que presenta característiques tant de M1 (HLA-DR i IL-1 β) com de M2 (CD163 i TGF- β) i una baixa expressió de PD-L1. El tractament amb IFN- γ / β -glucan repolaritzaria els macròfags pleurals cap a un fenotip M1 (adaptada de Wu, M.F. *Cancer Immunol. Immunother.* 2021).

Altres investigadors han avaluat el valor diagnòstic i pronòstic de la població de macròfags dels VPMs. D'una banda, Pei i col·laboradors proposen que l'elevada freqüència de macròfags CD14⁺ CD206⁺ en el VPM podria ser un potencial biomarcador pel diagnòstic del VPM, facilitant la seva discriminació dels VPBs¹⁴². D'altra banda, Yang i col·laboradors han demostrat que una elevada infiltració de la població CD14⁺CD163⁺ en el VPM en pacients amb càncer de pulmó es relaciona amb una pitjor supervivència lliure de progressió¹⁴³.

2.5.1.2. Neutròfils

Els neutròfils són els leucòcits més abundants en la sang perifèrica i constitueixen la principal línia de defensa de l'organisme davant de microorganismes patògens. En condicions fisiològiques, representen al voltant del 50-70% dels leucòcits circulants. Tot i això, la seva vida mitjana en el torrent sanguini és relativament curta, menys de 24 h, i està limitada per la mort cel·lular programada¹⁴⁴. S'originen i maduren a la medul·la òssia, on es produeixen uns $1-2 \cdot 10^{11}$ neutròfils/dia en un adult sà. La seva producció i vida mitjana es veuen incrementades en condicions d'inflamació o infecció sistèmica. Un cop activats, ja sigui pel reconeixement de microorganismes patògens o mediadors inflamatoris, migren ràpidament al focus de la inflamació seguint un gradient de quimiocines. La migració neutrofílica és un procés regulat que inclou diversos esdeveniments successius; des de canvis en l'expressió de receptors de superfície i molècules d'adhesió fins a canvis en el citoesquelet dels propis neutròfils i les cèl·lules endotelials¹⁴⁵. Hi ha evidències que relacionen un recompte de neutròfils superior al 50% en el VP amb un procés pleural agut, i podrien suggerir un diagnòstic de VP parapneumònic o VP derivat de malalties abdominals o d'una embòlia pulmonar. A més a més, en poc més del 7% dels VPs tuberculosos i el 20% dels VPMs també s'observa un predomini de neutròfils en el líquid pleural¹⁹.

Pel que fa al fenotip dels neutròfils, la seva heterogeneïtat i plasticitat són cada cop més reconegudes i venen donades principalment pel grau de maduresa, l'estat d'activació, els marcadors de superfície i la funció que realitzen¹⁴⁶. Es caracteritzen per tenir un nucli multilobular i una gran quantitat de grànuls i vesícules secretores en el citoplasma. Aquests grànuls es classifiquen en azurofíllics (primaris), específics (secundaris) i els que contenen gelatinasa (terciaris). Difereixen en el seu contingut i la seva capacitat de ser mobilitzats davant d'un estímul¹⁴⁷. El contingut d'aquests grànuls inclou una àmplia varietat de proteïnes que faciliten la comunicació intracel·lular, la migració neutrofílica, l'activitat bactericida i la remodelació tissular (**taula 4**)¹⁴⁸. Les proteïnes dels diferents grànuls són sintetitzades al llarg del procés de maduració dels neutròfils. Els grànuls azurofíllics, són els que contenen mediadors més tòxics i la seva exocitosis es produeix en una etapa tardana d'activació dels neutròfils. Les vesícules secretores, en canvi, contenen mediadors menys tòxics i són les que s'alliberen més ràpidament. El procés d'alliberació del contingut dels grànuls és una de les funcions principals del neutròfil en resposta a una infecció microbiana o altres signes d'inflamació i es coneix com a **desgranulació**.

Taula 4. Contingut dels grànuls dels neutròfils (adaptada de *Mollinedo, F. Trends Immunol. 2019*).

Tipus de grànul	Membrana	Contingut
Primaris	CD63 CD68	<ul style="list-style-type: none"> • MPO • Defensines • Azurocidina • Catepsina G • Proteinasa 3 • Lisozim • Arginasa I • Neutròfil elastasa (NE)
Secundaris	CD66b CD177 CD11b/CD18 CD15	<ul style="list-style-type: none"> • Lactoferrina • Metal·loproteïnasa de matriu 8 (MMP-8) • Pentraxina 3 • Lisozim • Catelicidin LL-37 • Olfactomedin 4
Terciaris	CD11b/CD18	<ul style="list-style-type: none"> • MMP-9 • Lisozim • Arginasa I • Heparanasa
Vesícules secretores	CD14 CD16 CD10 CD11b/CD18 CD45	<ul style="list-style-type: none"> • Proteïnes plasmàtiques (albúmina) • Fosfatasa alcalina

A banda de la desgranulació, els neutròfils també realitzen altres funcions com són la fagocitosi, l'esclat oxidatiu, l'alliberació de NETs i la secreció d'un ampli repertori de citocines¹⁴⁹.

La **fagocitosi** és la principal via d'eliminació dels microorganismes patògens i compren dues etapes. Primerament, té lloc el reconeixement i la internalització del microorganisme o substància estranya en el fagosoma. En segon lloc, el fagosoma es fusiona amb els lisosomes originant els fagolisosomes on es produirà la degradació i neutralització de la partícula ingerida¹⁵⁰. Durant aquest procés, es produeixen espècies reactives de l'oxigen (ROS) que juntament amb els enzims hidrolítics presents en el fagolisosoma destrueixen els microorganismes ingerits¹⁵¹.

La producció de ROS no té lloc únicament dins el fagolisosoma, sinó que també es pot alliberar extracel·lularment en resposta a agents infecciosos, xenobiòtics, citocines i quimiocines¹⁵².

Aquest procés és conegut com a **esclat oxidatiu**. El procés s'inicia amb l'activació de la *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) oxidasa que actua com a cadena de transport d'electrons i redueix l'oxigen molecular a superòxid (O_2^-), i aquest al mateix temps és el precursor d'altres ROS secundàries¹⁵³. Els neutròfils també poden alliberar espècies RNS, que igual que ROS, tenen propietats antimicrobianes i també actuen com a molècules de senyalització en diverses vies fisiològiques dels neutròfils¹⁵⁴. Convé destacar que la producció de ROS pot potenciar la resposta antimicrobiana dels neutròfils induint-los la desgranulació i la NETosi¹⁵².

La funció del neutròfil que s'ha descobert més recentment ha estat l'alliberació de NETs. Aquest procés rep el nom de **NETosi** i es tracta d'una forma de mort cel·lular caracteritzada per l'alliberació de la cromatina descondensada i proteïnes dels grànuls¹⁵⁵. Es forma una espècie de xarxa que facilita la mort del microorganisme patògen i n'evita la disseminació. S'han descrit diversos estímuls capaços d'induir la formació de NETs, inclosos mediadors inflamatoris com la IL-8, immunocomplexos, microorganismes patògens i les plaquetes¹⁵⁶. Es distingeixen dos tipus de NETosi: la suïcida (**figura 7a**) i la vital (**figura 7b**)^{157,158}.

- La **NETosi suïcida, o lítica**, és induïda després d'hores d'estimulació per diversos estímuls, inclosos el PMA (de l'anglès, *phorbol 12-myristate 13-acetate*) o autoanticossos. Un cop rebut l'estímul, s'activa la NADPH oxidasa i es produeix ROS que, al seu torn, activa l'enzim PAD4 (de l'anglès, *protein-arginine deaminase type 4*). Aquest, amb l'ajuda de la MPO i la NE, promou la descondensació de la cromatina i el trencament de la membrana nuclear. La cromatina s'allibera al citosol on serà decorada amb proteïnes dels grànuls del neutròfil (NETs). Finalment, es produirà el trencament de la membrana plasmàtica que permetrà l'alliberació de les NETs a l'espai extracel·lular i conduirà a la mort del neutròfil^{157,158}.
- La **NETosi vital, o no-lítica**, és induïda en qüestió de minuts en resposta a microorganismes o plaquetes activades que activen els TLRs de la superfície del neutròfil. Un cop rebut l'estímul, s'activarà l'enzim PAD4, que es traslladarà al nucli juntament amb la NE, per descondensar de la cromatina i trencar la membrana nuclear. A diferència de la NETosi suïcida, la cromatina, decorada amb proteïnes dels grànuls dels neutròfils, s'expulsa a través de vesícules sense que es produeixi la ruptura de la membrana plasmàtica. El neutròfil resta viu i pot realitzar altres funcions, com per exemple la fagocitosi^{157,158}.

Una altra funció destacada dels neutròfils és **l'alliberació de mediadors** proinflamatoris, incloses citocines, com la IL-1 β , la IL-6, la IL-18 i el TNF- α , i quimiocines, com la IL-8, la CCL22 i la CXCL10. També poden secretar citocines antiinflamatòries com el TGF- β 1 i TGF- β 2 i factors angiogènics com l'VEGF¹⁵⁹. Alguns d'aquests mediadors, com la IL-8, actuen de forma autocrina, reclutant més neutròfils i induint l'activació d'aquests, mentre que n'hi ha d'altres que modulen l'acció d'altres cèl·lules efectores del sistema immunitari.

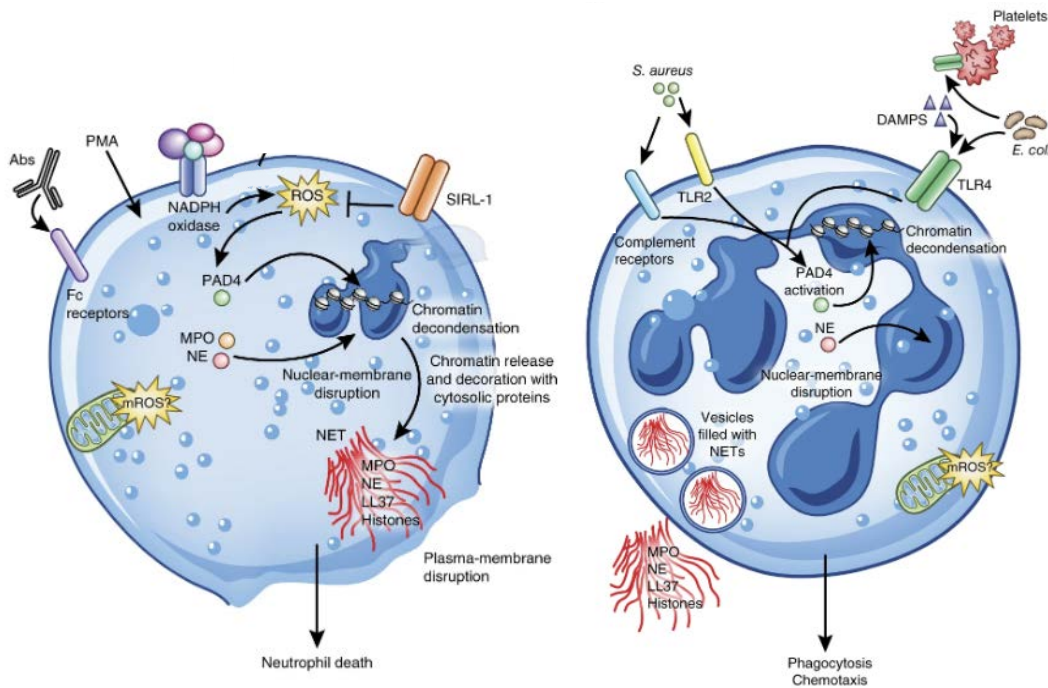


Figura 7. Mecanismes implicats en la NETosis vital i la suïcida. (adaptada de Jorch, SK. *Nat. Med.* 2017).

Inicialment, el neutròfil es va descriure com una cèl·lula dissenyada simplement per combatre les infeccions. No obstant això, els avenços científics dels darrers anys han revelat que els neutròfils posseeixen un ampli repertori de respostes funcionals que van més enllà d'atrapar i matar microorganismes. Han guanyat especial atenció en el context tumoral per la seva implicació, tant en les etapes més inicials del càncer, com en estadis més avançats on es produeix metàstasi cap a altres òrgans¹⁶⁰. Tot i això, el paper del neutròfil en la metàstasi pleural ha estat poc estudiat. D'una banda, són capaços de promoure el creixement tumoral directament a través de la secreció de prostaglandina E2, NE, la catepsina G i MMP-9 o indirectament a través de la supressió de la resposta dels limfòcits T^{161,162}. A més a més, les NETs poden protegir les cèl·lules tumorals de l'atac dels limfòcits T citotòxics i despertar-les de l'estat latent. Les proteïnases de les NETs poden degradar la MEC promovent l'extravasació de les cèl·lules tumorals i la metàstasi^{162 163}. D'altra banda, els neutròfils també poden exercir un paper antitumoral a través de l'alliberació de ROS i RNS, que són productes genotòxics^{164,165}, o

a través de l'alliberació de molècules citotòxiques dels seus grànuls, com la lactoferrina¹⁶⁶. Un altre mecanisme a través del qual els neutròfils poden destruir les cèl·lules tumorals és induint-los l'apoptosi a través del lligand de mort TRAIL¹⁶⁷. La composició molecular del microambient tumoral modula la plasticitat dels neutròfils, essent el TGF- β un dels principals factors involucrats en la polarització cap a un fenotip protumoral i l'IFN- γ cap a un fenotip antitumoral¹⁶⁴. Clínicament, els neutròfils i els seus microRNAs circulants serveixen com a biomarcadors per a la detecció del càncer CPCNP i són un predictor independent de mal pronòstic en pacients amb estadis avançats d'aquest tipus de càncer¹⁶⁸.

En pacients amb VPM derivat de càncer de pulmó, diversos estudis han mostrat que una proporció neutròfil/limfòcit elevada en el líquid pleural s'associava negativament amb la supervivència^{169,170}. En línia amb aquests resultats, el nostre grup de recerca va observar una correlació negativa entre la quantitat de neutròfils dels VPMs i la supervivència dels pacients amb adenocarcinoma pulmonar. En concret, els VPM que presentaven més cèl·lules tumorals també eren aquells que tenien més neutròfils⁹⁷. Altres investigadors van determinar un increment dels factors quimioatracients de neutròfils, com LTB4 i IL-8, en líquids pleurals malignes en comparació amb transsudats^{101,171}. En el cas de ENA-78, un altre factor quimioatracient, els nivells tendien a ser superiors en els VPMs, en comparació amb transsudats, i es correlacionaven amb els nivells pleurals de MPO i NE¹⁰². Pel que fa al fenotip, l'expressió de CD11b i CD18 estava incrementada en els neutròfils del VPM respecte als de sang perifèrica, mentre que l'expressió de CD62L estava disminuïda. La combinació de CD11b i CD18 formen el complex Mac-1; el seu increment estaria indicant una major extravasació de neutròfils i una major activitat fagocítica en el VPM¹⁷². D'altra banda, tot i que la freqüència de neutròfils no és molt elevada en els VPM, s'han quantificat concentracions més elevades d'algunes de les molècules secretades per aquestes cèl·lules, com la MPO i la MMP-9 en VPMs que no pas en transsudats. Aquestes dades podrien suggerir una major activitat neutrofílica en aquest context metastàtic^{173,174}. Cal tenir present que algunes d'aquestes molècules no són exclusives dels neutròfils, sinó que també poden ser secretades pels macròfags. La **figura 8** mostra una representació esquemàtica de les funcions que estaria realitzant el neutròfil en el microambient tumoral del VPM.

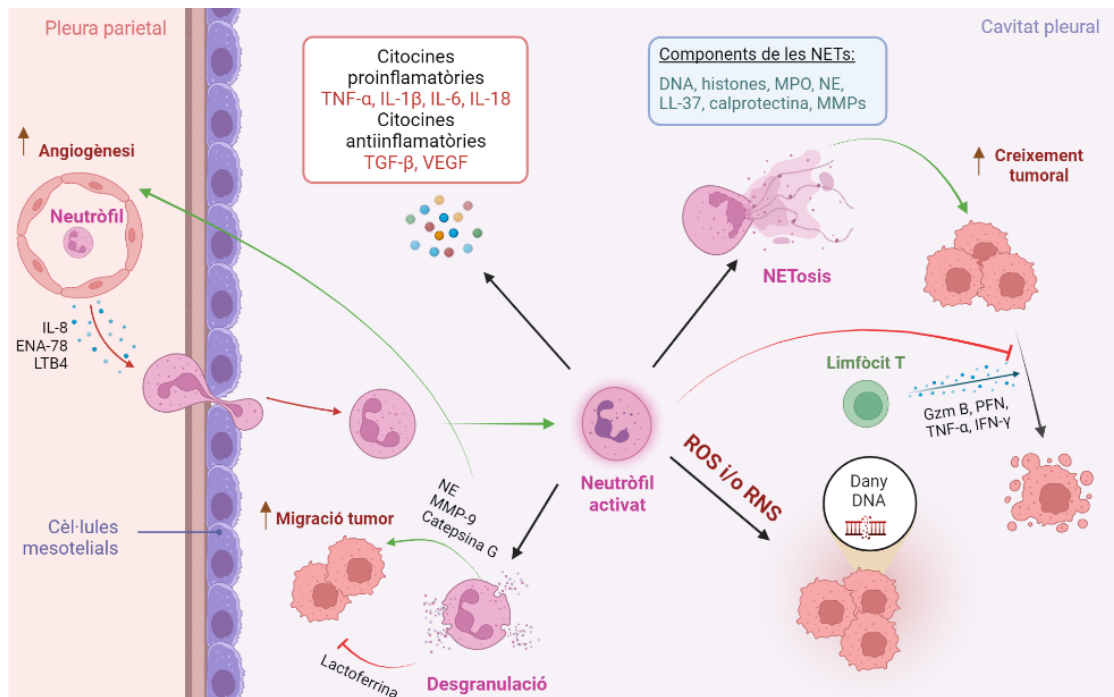


Figura 8. Model representatiu de les funcions del neutròfil en el microambient tumoral del vessament pleural maligne. El neutròfil migra a la cavitat pleural reclutat per les molècules IL-8, ENA-78 i LTB4. Un cop allà, realitza diverses funcions, tals com la desgranulació, la NETosi, la secreció de citocines pro i antiinflamatòries i l'alliberació de ROS i RNS. També protegeix les cèl·lules tumorals de la resposta citotòxica dels limfòcits T (*imatge creada amb Biorender.com*).

2.5.1.3. Plaquetes

Les plaquetes són components subcel·lulars o fragments cel·lulars discoides originats a partir de cèl·lules precursors anomenades megacariòcits en la medul·la òssia. Són els elements més petits circulant pel torrent sanguini, al voltant de $150 \text{ a } 400 \cdot 10^9 / \text{L}^{175}$, amb un diàmetre de 2-4 μm i un de gruix de 0,5 μm . La vida mitjana de les plaquetes en sang és d'entre 7 i 10 dies¹⁷⁶, transcorregut aquest temps són eliminades principalment per macròfags en el fetge¹⁷⁷. Tot i no tenir nucli, disposen de la maquinària necessària per sintetitzar determinades proteïnes fent servir com a motlle l'RNA missatger (RNAm), emmagatzemar-les i alliberar-les quan la situació inflamatòria ho requereixi¹⁷⁸. A més a més, també són capaces de captar soluts i partícules petites a través d'un procés similar a la fagocitosi i/o proteïnes plasmàtiques per endocitosis¹⁷⁹. Tenen un paper clau en el manteniment de la integritat de l'endoteli vascular i el control de l'hemorràgia en cas de dany vascular. D'altra banda, actuen com a moduladors de la inflamació¹⁸⁰.

En condicions fisiològiques, circulen pel torrent sanguini en un estat de "repòs", en rebre un estímul d'activació, pateixen una sèrie de canvis conformacionals que els fan adoptar una

forma esferoïdal amb pseudòpodes i alliberar el contingut dels seus grànuls (**taula 5**)¹⁸¹. Les plaquetes s'activen quan hi ha dany vascular, per la presència de patògens o quan hi ha inflamació. Així doncs, es coneixen diversos estímuls capaços d'activar la plaqueta, alguns d'ells produïts per les mateixes plaquetes com la trombina, el tromboxà A₂ i l'adenosina difosfat (ADP) i altres que deriven d'altres cèl·lules, com les NETs i les citocines proinflamatories¹⁸²⁻¹⁸⁴. Els lligands de TLRs, la presència de determinats autoanticossos i el sistema del complement també poden activar la plaqueta¹⁸⁵⁻¹⁸⁷.

Taula 5. Contingut dels grànuls de les plaquetes (adaptada de *Fitch-Tewfik, J.L. Front. Endocrinol. 2013*).

Tipus de grànul	Distribució en la plaqueta	Contingut
Grànuls α	50-80 grànuls/plaqueta	<ul style="list-style-type: none"> • Proteïnes de membrana i/o solubles (P-selectina, CD40L, αIIbβ3) • Proteïnes pro-/anti-coagulants (Factor V, plasminogen) • Factors de creixement (EGF, TGF-β, PDGF) • Factors angiogènics (VEGF) • Proteïnes d'adhesió (fibrinogen i vWf) • Quimiocines (PF4, CXCL12, CCL5, CXCL7, CXCL1) • Altres mediadors solubles (histamina, immunoglobulines, proteïnes del sistema del complement)
Grànuls densos	3-8 grànuls/plaqueta	<ul style="list-style-type: none"> • Nucleòtids (ADP, ATP) • Cations (Calci, Magnesi) • Amines bioactives (serotonina, histamina) • Polifosfats
Lisosomes	poc abundants	<ul style="list-style-type: none"> • Proteïnes estructurals associades a la membrana lisosomal (LAMP-1, LAMP-2 i CD63). • Vasomoduladors (catecolamines, vasostatines) • Cations (calci, sodi) i anions (clorur) • Nucleòtids (ADP, ATP) • Fosfatasa àcida

ADP, adenosine diphosphate; ATP, adenosine triphosphate; LAMP, lysosome-associated membrane glycoprotein; PF4, factor plaquetari IV; vWf, von Willebrand Factor.

Amb l'activació plaquetària, les proteïnes de membrana contingudes en els grànuls passen a expressar-se a la superfície de la plaqueta, com és el cas de la P-selectina i el CD40L; mentre que les proteïnes solubles s'alliberen al compartiment extracel·lular. Les plaquetes activades i/o alguns dels seus productes interaccionen amb els neutròfils, monòcits i limfòcits i en

modulen les seves funcions. D'entre els factors immunomoduladors alliberats per la plaqueta, destaquen sobretot el TGF- β , el VEGF, el PF4, la P-selectina i el CD40L. Tant la P-selectina com el CD40L es poden trobar solubles o com a proteïna transmembrana. D'altra banda, les plaquetes també són capaces d'alliberar micropartícules plaquetàries (PMPs, de l'anglès, *platelet microparticles*) enriquides amb factors de coagulació i altres proteïnes contingudes en els grànuls de les plaquetes, lípids i RNA¹⁷⁵. Aquestes PMPs faciliten la comunicació entre les plaquetes i les cèl·lules de l'entorn.

En processos fisiopatològics com el càncer, sobretot en estadis avançats, hi ha un increment del nombre de plaquetes circulants. En particular, en pacients amb càncer de pulmó, aquest increment s'ha associat a un mal pronòstic¹⁸⁸. Les cèl·lules tumorals recluten a les plaquetes com aliades per a què promoguin el creixement tumoral, l'angiogènesi, i les ajudin a formar nous nínxols tumorals crucials per la metàstasi¹⁸⁹. En resposta a senyals d'activació tumoral, el proteoma de les plaquetes de pacients amb càncer canvia respecte al dels individus sans. Aprofitant aquestes diferències, estudis recents ja proposen diverses proteïnes plaquetàries com a biomarcadors per al diagnòstic precoç de diferents tipus de càncers^{190,191}. Estudis preliminars mostren que diversos paràmetres plaquetaris estarien relacionats amb l'aparició de metàstasi pleural en pacients amb càncer de pulmó¹⁹². Altres autors proposen que els nivells de plaquetes i altres paràmetres relacionats amb la coagulació podrien ser útils per diferenciar els VPs derivats de tuberculosi i els VPMs derivats de càncer de pulmó, essent més elevats en el primer cas¹⁹³. Llevat d'aquestes dades, el paper de la plaqueta en el VPM requereix ser estudiat en més detall. A nivell molecular, s'han quantificat concentracions més elevades de VEGF, TGF- β en exsudats en comparació amb transsudats que podrien indicar una major activació de la plaqueta en la cavitat pleural¹⁹⁴. Tot i això, no són productes exclusius de les plaquetes, així doncs, no necessàriament reflecteixen l'activitat de la plaqueta. Pel que fa al nombre de PMPs, Roca i col·laboradors no van observar diferències significatives entre VPMs i VPBs¹⁹⁵.

2.5.2. Sistema immunitari adaptatiu

El sistema immunitari adaptatiu, a diferència del sistema innat, genera respostes específiques dirigides a antígens estranys, ja siguin de microorganismes patògens, substàncies tòxiques o cèl·lules tumorals. Es distingeixen dos tipus de resposta adaptativa: la cel·lular, mediada pels limfòcits T i la humoral, mediada pels limfòcits B¹⁹⁶. La resposta adaptativa s'inicia amb el reconeixement de l'agent estrany per part dels fagòcits del sistema immune innat, com les DC i

els macròfags residents del teixit afectat. Aquestes cèl·lules migraran cap als òrgans limfoides secundaris més propers (ganglis limfàtics o melsa) on presentaran els antígens als limfòcits verges circulants per activar-los. Un cop activats, experimenten un procés d'expansió clonal i es diferencien cap a cèl·lules efectores¹⁹⁷. Aquestes tenen una vida útil limitada, un cop s'elimina l'antigen, la majoria moren per apoptosi. No obstant, algunes cèl·lules efectores persisteixen i conformen el que es coneix com a memòria immunitària. D'aquesta manera, es garanteix poder respondre de forma més ràpida i eficient en cas de produir-se futures exposicions a aquell antigen concret. El sistema immune adaptatiu és capaç de respondre davant d'un ampli repertori d'antígens diferents gràcies a la variabilitat existent en les estructures d'unió a l'antigen dels receptors específics, TCR, en cas dels limfòcits T i, BCR, en cas dels limfòcits B^{197,198}. El primer cop que reconeix l'antigen, es necessiten al voltant de 7-10 dies perquè es desenvolupi la resposta adaptativa. Alteracions en la modulació de la resposta adaptativa pot comportar l'aparició de malalties autoimmunes, al·lèrgies i immunodeficiències.

En el càncer, la resposta immunitària adaptativa s'inicia amb el reconeixement dels antígens associats al tumor per part dels limfòcits T. Els antígens tumorals són presentats en les molècules MHC-I i MHC-II expressades a la superfície de les cèl·lules tumorals o de les cèl·lules presentadores d'antígens¹⁹⁹. Els limfòcits T s'activaran, tindrà lloc l'expansió clonal i el reclutament d'altres cèl·lules del sistema immunitari innat. Els limfòcits T, al seu torn, activaran els limfòcits B. En última instància, la cèl·lula tumoral serà destruïda per diverses vies: 1) la lisi directa per part dels limfòcits T i 2) la citotoxicitat cel·lular indirecta depenent d'anticossos (ADCC, de l'anglès *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) i l'activació de la cascada del complement²⁰⁰. Tot i això, les cèl·lules tumorals poden desenvolupar una sèrie de mecanismes per tal d'evadir la resposta del sistema immunitari, incloses la secreció de citocines immunosupressores i la pèrdua de l'expressió de les molècules de presentació antigènica MHC²⁰⁰. Els tumors també poden protegir-se de l'atac immunitari exposant a la seva superfície inhibidors de punts de control immunitari, com el PD-L1. D'aquesta manera, els limfòcits T que expressin PD-1 en interaccionar amb el PD-L1 de les cèl·lules tumorals reduiran la seva activació i citotoxicitat²⁰¹. Aquesta estratègia és la base d'alguns tractaments d'immunoteràpia contra el càncer.

A continuació s'expliquen, en més detall, les característiques i funcions generals dels limfòcits T i B i el seu paper en el microambient tumoral, en especial, en el VPM.

2.5.2.1. Limfòcits T

Els limfòcits T són cèl·lules efectores imprescindibles per la modulació i la coordinació de la resposta immunitària. En condicions fisiològiques, representen al voltant del 10-25% dels leucòcits circulants. Són responsables de la destrucció de les cèl·lules infectades per microorganismes patògens i de les cèl·lules tumorals a través del contacte directe i/o la secreció de citocines²⁰². S'originen a partir d'una cèl·lula hematopoètica limfoide en la medulla òssia i migren al timus on maduraran i aniran adquirint diferents molècules a la seva superfície, com el receptor de la cèl·lula T (TCR). Aquest receptor és necessari per al reconeixement dels pèptids presentats en l'MHC i és el que determinarà l'especificitat del limfòcit T¹⁹⁸. L'activació dels limfòcits T requereix que tingui lloc aquesta interacció juntament amb una segona senyal coestimuladora²⁰³. Un cop activats, experimenten una expansió clonal i, després d'una tercera senyal donada per citocines, es diferencien cap a cèl·lules efectores i de memòria. D'altra banda, els limfòcits T també poden expressar receptors coinhibidors, altrament coneguts com inhibidors de punts de control immunitari, per limitar la seva activació i expansió. En són exemples el CTLA-4, PD-1, TIM-3, TIGIT, LAG-3 i PD-L1^{203,204}.

Tradicionalment, els limfòcits T es classifiquen en 2 grans grups: els que expressen el correceptor CD4 (limfòcits T CD4⁺) i reconeixen els antígens en el context de MHC-II, i els que expressen el correceptor CD8 i reconeixen els antígens presentats en el context de MHC-I (limfòcits T CD8⁺). Dins els limfòcits T CD4⁺ podem distingir els limfòcits T col·laboradors (Th, de l'anglès *helper T lymphocyte*) i els limfòcits Tregs.

Els **limfòcits T CD4⁺ col·laboradors** modulen l'activació i la diferenciació de cèl·lules del sistema immunitari innat (macròfags, neutròfils, NK) i del adaptatiu (limfòcits T i B) a través de la secreció d'un ampli repertori de citocines. A data d'avui, se'n distingeixen diversos subpoblacions en funció de les citocines que produeixen i les funcions que realitzen: Th1, Th2, Th17, Th9, Th22 i les Th fol·liculars (**taula 6**)²⁰⁵⁻²⁰⁷. La diferenciació cap a cadascuna de les subpoblacions està dirigida pels factors solubles presents en el microambient, la concentració d'antigen, el tipus de cèl·lula presentadora d'antigen i les molècules coestimuladores^{205,208}.

Els **limfòcits Tregs** constitueixen una subpoblació de limfòcits T CD4⁺ encarregats de la supressió de la resposta immunitària tant en condicions fisiològiques com patològiques. Juguen un paper clau en el manteniment de la tolerància perifèrica als autoantígens i la limitació de la inflamació crònica i les respostes antitumorals. Representen el entre un 5 i un 10% del total de limfòcits T CD4⁺ i es caracteritzen per una elevada expressió de la cadena α del receptor de la IL-2 (CD25), el factor de transcripció FOXP3 i la pèrdua d'expressió de la

cadena α del receptor de la IL-7 (CD127)²⁰⁹. Disposen de diversos mecanismes per exercir els seus efectes immunosupressors, inclosos: 1) la secreció de citocines antiinflamatòries com la IL-10, el TGF- β i la IL-35; 2) l'apoptosi de la cèl·lula diana per privació de citocines com la IL-2 en el cas dels limfòcits T; 3) la supressió per citòlisi a través de l'alliberació de granzims i perforina²¹⁰ i 4) l'expressió de receptors coinhibidors, com el CTLA-4 i el LAG-3²¹¹.

Taula 6. Funcions efectores i citocines produïdes per les subpoblacions de limfòcits T CD4⁺ (*adaptada de Luckheerman, RV. Clin. Dev. Immunol. 2012; Mirshafiey, A. Int. J. Dermatol. 2015; Chen, J. Annu. Rev. Immunol. 2020*).

Subpoblacions de limfòcits T CD4 ⁺	Citocines produïdes	Funcions efectores
T helper 1 (Th1)	IFN- γ , IL-2 i IL-12	<ul style="list-style-type: none"> • Eliminar patògens intracel·lulars (bacteris, virus i alguns protozous). • Promoure el reclutament i l'activació dels macròfags. • Promoure l'estimulació dels limfòcits T citotòxics.
T helper 2 (Th2)	IL-4, IL-5 i IL-13	<ul style="list-style-type: none"> • Eliminar paràsits extracel·lulars, inclosos els helmints. • Contribuir a l'activació dels limfòcits B per a que produeixin anticossos.
T helper 17 (Th17)	IL-17A, IL-17F, IL-21 i IL-22	<ul style="list-style-type: none"> • Eliminar bacteris i fongs extracel·lulars. • Promoure el reclutament i la maduració de eosinòfils. • Induir la producció de IgE.
T helper 9 (Th9)	IL-9	<ul style="list-style-type: none"> • Eliminar paràsits. • Estimular la resposta inflamatòria al·lèrgica.
T helper 22 (Th22)	IL-13, IL-22 i TNF- α	<ul style="list-style-type: none"> • Participar en la patogènesi dels trastorns inflamatoris de la pell. • Promoure la reparació tissular.
T helper fol·licular (Thf)	IL-6, IL-10, IL-12 i IL-21	<ul style="list-style-type: none"> • Promoure la formació de centres germinals, la proliferació dels limfòcits. • proliferació i la diferenciació de limfòcits B en els centres germinals.

Els **limfòcits T CD8⁺**, també anomenats citotòxics, són especialment importants en la defensa davant de patògens intracel·lulars eliminant directament la cèl·lula infectada o els patògens citosòlics. També poden infiltrar-se en tumors per a destruir les cèl·lules malignes. El mecanisme principal pel qual destrueixen les cèl·lules diana es basa en l'alliberació de grànuls lítics que contenen perforina, granzims i granulisin. La perforina forma porus a la membrana de la cèl·lula diana per tal que els granzims puguin entrar passivament i induir l'apoptosi activant

directament o indirectament la via de les caspases²¹². Un altre mecanisme descrit és la secreció de citocines proinflamatòries com l'IFN- γ o el TNF- α que destrueixen el tumor a través de diversos mecanismes. D'una banda, l'IFN- γ pot augmentar l'expressió d'antígens tumorals presentats en el context d'MHC-I convertint les cèl·lules malignes en millors dianes per l'activitat citotòxica dels limfòcits T. D'altra banda, ambdues molècules actuen com a citocines citotòxiques juntament amb el granzim B per induir l'apoptosi de les cèl·lules tumorals^{213,214}. Tanmateix, el TNF- α és capaç de danyar l'endoteli vascular associat al tumor. Finalment, el tercer mecanisme descrit és la inducció d'apoptosi de la cèl·lula diana a través de la via Fas-Fas lligand. La majoria dels limfòcits T citotòxics efectors moren un cop s'ha resolt la infecció/inflamació i són eliminats per les cèl·lules fagocítiques. No obstant, una població de limfòcits T es diferencia cap a cèl·lules memòria que podrà respondre ràpidament davant d'infeccions posteriors per al mateix patògen. En els darrers anys, s'ha demostrat l'existència d'una subpoblació de limfòcits T CD4⁺ capaços de secretar granzim B i que, per tant, són citotòxiques per les cèl·lules diana²¹⁵.

Centrant l'interès en els VPs, s'observa un predomini de limfòcits T principalment en exsudats derivats de tuberculosi o metàstasi tumorals i acostuma a ser un indicatiu d'un procés pleural crònic²³. Diversos estudis on s'analitzen les poblacions limfocitàries dels VPMs mostren un increment de la freqüència de limfòcits T memòria reflex de l'activació crònica específica contra els antígens tumorals²¹⁶. En la majoria dels casos, els VPMs estan enriquits en limfòcits T CD4⁺ en comparació amb la sang perifèrica (**figura 9**). En concret, predomina el fenotip Th2 que afavoreix la formació del VPM i la progressió del tumor^{217,218}. Les proporcions entre limfòcits T CD4⁺/CD8⁺ en els VPM són variables probablement degut a l'heterogeneïtat entre els pacients, l'estadi del càncer, el tractament previ que han rebut i la quantitat de líquid drenat. El nostre grup de recerca va observar que la supervivència després del diagnòstic del VPM s'associava directament amb el nombre absolut de limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺ en pacients amb càncer de pulmó⁹⁷. Altres autors descriuen que el percentatge de limfòcits Tregs és significativament major en els VPMs que en els VPBs i s'associa a la progressió de la malaltia. Per tant, els pacients amb un menor percentatge de limfòcits Tregs tenien una millor esperança de vida. Els resultats d'aquest estudi suggereixen el potencial que presenten aquestes cèl·lules com a dianes pel disseny de teràpies antitumorals²¹⁹. En línia amb aquestes dades, una proporció elevada de Tregs/Th17 s'ha associat amb un mal pronòstic en pacients amb VPM²²⁰.

Funcionalment, s'ha observat que l'activitat citotòxica dels limfòcits T es troba disminuïda en el VPM en comparació amb la sang perifèrica dels mateixos pacients. Alguns autors atribueixen la

reducció de la citotoxicitat dels limfòcits T a les elevades concentracions de TGF- β dels VPMs¹³⁷. Donada la complexitat molecular del microambient tumoral, és probable que existeixin altres factors solubles que puguin estar modulant la funció dels limfòcits T en el VPM. Fenotípicament, hi ha evidències que demostren que els limfòcits T del VPM de pacients amb càncer de pulmó expressen més receptors coinhibidors CTLA-4, PD-1 i TIM-3 en comparació amb els limfòcits de sang perifèrica¹³⁷. En pacients amb VPM derivat de mesotelioma també s'ha descrit un augment dels receptors coinhibidors PD-1 i TIM-3, juntament amb el LAG-3. L'expressió de receptors coinhibidors es relaciona amb la disfunció dels limfòcits T en el microambient tumoral²²¹.

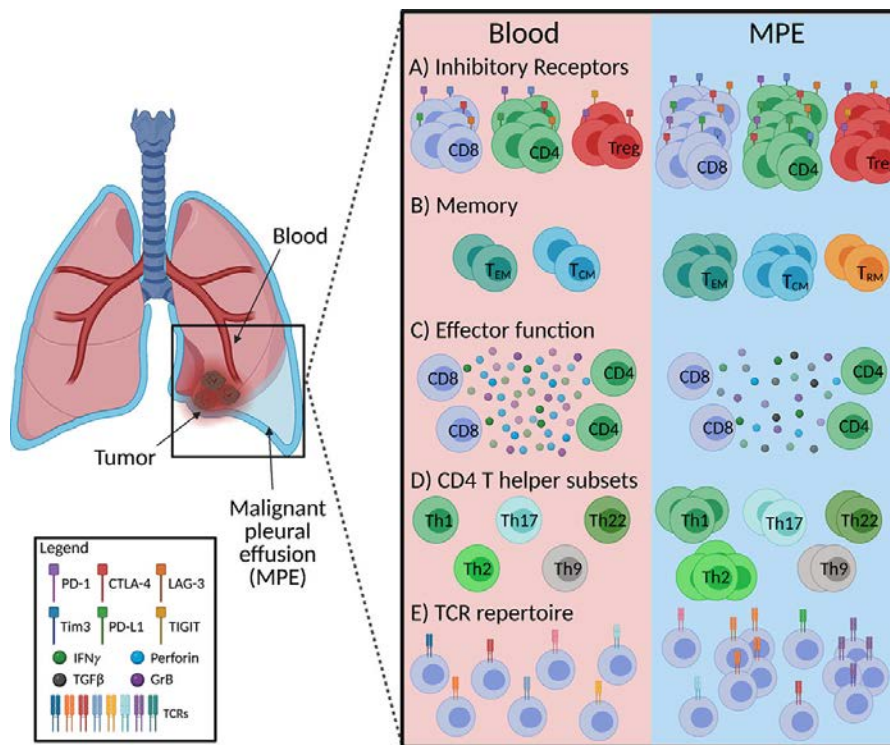


Figura 9. Model representatiu de la distribució dels limfòcits T en la sang perifèrica i el vessament pleural maligne en pacients amb càncer de pulmó. (A) Les freqüències de limfòcits T CD4⁺, CD8⁺ i Tregs que expressen receptors coinhibidors i de **(B)** limfòcits T memòria són majors en els VPM que en sang perifèrica. **(C)** L'alliberació de molècules efectoras (TGF- β , IFN- γ , granzims i perforina) és menor en el VPM en comparació amb la sang perifèrica. **(D)** El VPM està enriquit amb limfòcits T CD4⁺ col·laboradors, en concret de Th2 en comparació amb la sang perifèrica. **(E)** Hi ha un repertori de limfòcits T reactius al tumor més clonal en el VPM que en sang perifèrica (adaptada de *Principe, N. Front. Oncol. 2021*).

2.5.2.2. Limfòcits B

Els limfòcits B són les cèl·lules efectoras de la immunitat humoral i s'encarreguen d'eliminar els microorganismes patògens principalment mitjançant la producció d'immunoglobulines (Ig) que reconeixen antígens específics. Aquestes Ig, també anomenades anticossos, neutralitzen els

patògens i toxines, en faciliten l'opsonització i activen el complement²²². N' existeixen de diversos tipus (IgG, IgM, IgE, IgA, i IgD) cadascun amb estructures i funcions específiques. Es poden trobar circulant en sang, en teixits extravasculars o bé a la mateixa membrana dels limfòcits B actuant com a receptor d'antigen dels limfòcits B (BCR). A banda de la producció d'anticossos, els limfòcits B també són necessaris per a l'inici de les respostes immunitàries dels limfòcits T²²³. En condicions fisiològiques, representen al voltant del 3-10% dels leucòcits circulants. Es formen a la medul·la òssia i maduren a la melsa^{224,225}. Quan el BCR reconeix l'antigen en qüestió, s'activa amb la col·laboració dels limfòcits T CD4⁺, es diferencia i dona lloc a cèl·lules plasmàtiques o limfòcits B memòria. La interacció entre el CD40L (expressant en la superfície dels limfòcits T) i el CD40 (expressat en la superfície dels limfòcits B) és clau per a la maduració i proliferació dels limfòcits B i la generació de cèl·lules plasmàtiques²²⁶. Existeix una altra subpoblació de limfòcits B, coneguda com a limfòcits B reguladors (Bregs). Igual que els limfòcits Tregs, aquestes cèl·lules produeixen IL-10, IL-35, TGF- β i són capaces de suprimir la diferenciació dels limfòcits T proinflamatoris (Th1 i Th17)²²⁷.

En el microambient tumoral, es distingeixen diversos subconjunts de limfòcits B amb funcions pro- i antitumorals. D'una banda, els limfòcits Bregs contribueixen a generar un microambient tumoral immunosupressor, reprogramant els macròfags cap a un fenotip protumoral i limitant la citotoxicitat dels limfòcits T²²⁸. D'altra banda, els limfòcits B antitumorals secreten citocines que coordinen la resposta citotòxica dels limfòcits T²²⁹. A més a més, participen en la destrucció de les cèl·lules tumorals a través de la citotoxicitat cel·lular dependent d'anticossos (ADCC, de l'anglès *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) i l'activació de la cascada del complement. L'ADCC es basa en la capacitat dels anticossos de recobrir la cèl·lula diana, en aquest cas la tumoral, i induir-li la mort a través de mecanismes no fagocítics²³⁰. Clínicament, la presència de limfòcits B infiltrants de tumor s'ha relacionat amb un pronòstic favorable en diversos tipus de càncer inclòs el de pulmó²³¹.

A diferència dels limfòcits T, la informació disponible sobre les funcions dels limfòcits B en el VPM és molt limitada. Estudis amb models murins han demostrat la implicació dels limfòcits B activats en la formació del VPM i la modulació de les respostes Th1/Th17²³². Pel que fa al fenotip, els limfòcits B verges (*naïve*, en anglès) del VPM tenien una major expressió de molècules associades a la presentació antigènica, CD80 i CD86; molècules d'activació, CD44 i CD69 i, de PD-L1 en comparació amb els limfòcits B verges de la sang i la melsa²³². En humans, s'ha observat una reducció del nombre de limfòcits B en el VPM respecte a la sang perifèrica dels mateixos pacients. En particular, un estudi on s'ha aplicat la metodologia *single-cell* ha mostrat un predomini dels limfòcits Bregs en el VPM en comparació amb la sang de pacients

amb càncer de pulmó. Els investigadors han identificat 3 subpoblacions de Bregs amb un perfil genètic concret. Aquestes cèl·lules del VPM presentaven un augment de l'expressió dels gens associats al metabolisme de la glucosa, gens de resposta a la hipòxia i de proliferació cel·lular en comparació amb els Bregs de la sang indicant que una major activitat d'aquesta cèl·lula en la cavitat pleural¹⁴¹. D'altra banda, Telvi i col·laboradors van observar concentracions superiors de IgG, IgA i IgM en el sèrum de pacients amb tuberculosi o càncer respecte al VP. Tot i no observar diferències en funció de l'etiologia de l'exsudat, la concentració pleural de IgG era superior a la de IgM i aquesta superior a la de IgA²³³. La **figura 10** correspon a un model representatiu de les interaccions entre les cèl·lules del sistema immunitari adaptatiu i les cèl·lules tumorals en els VPMs.

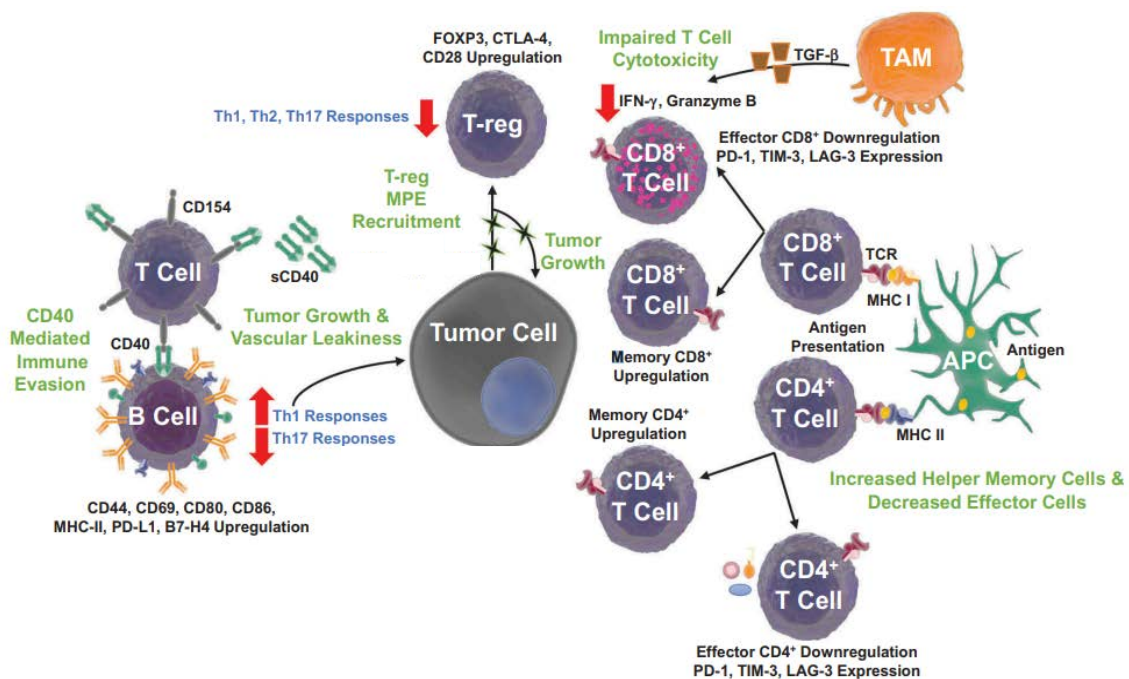


Figura 10. Interaccions entre les cèl·lules del sistema immunitari adaptatiu i les cèl·lules tumorals en el vessament pleural maligne. Les cèl·lules tumorals secreten factors que promouen la migració i activació dels limfòcits Tregs. Hi ha un augment dels limfòcits T memòria i una disminució dels T efectors. Les funcions dels limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺ efectors es veuen limitades per l'expressió de PD-1, TIM-3 i LAG-3. Els macròfags associats al tumor secreten TGF-β que disminueixen la capacitat citotòxica dels limfòcits T. Els limfòcits B augmenten l'expressió de molècules implicades en la presentació antigènica i activació dels limfòcits Th2 i expressen més PD-L1. Els nivells elevats de CD40 soluble del VPM competeixen amb el CD40 expressat en la superfície dels limfòcits B per la unió al seu lligand CD40L (CD154) expressat a la superfície dels limfòcits T. Així queda limitada l'ajuda que els limfòcits B proporciona als limfòcits T per a que s'activin i viceversa (adaptada de Murthy, P. *Oncoimmunology*. 2019).

2.6. FACTORS SOLUBLES IMMUNOMODULADORS PRESENTS EN VESSAMENT PLEURAL MALIGNE

2.6.1. TNF- α

El TNF- α és una citocina proinflamatòria multifuncional produïda majoritàriament pels monòcits/macròfags activats, però també per neutròfils, limfòcits T, cèl·lules NK i cèl·lules endotelials^{234,235}. Aquesta molècula pot senyalitzar a través de dos tipus de receptors, el receptor TNF de tipus 1 (TNFR1) que s'expressa de forma ubiqua i el de tipus 2 (TNFR2) que s'expressa en algunes cèl·lules del sistema immunitari, preferentment les Tregs, cèl·lules endotelials i el sistema nerviós²³⁶. Està implicada en la modulació de diversos mecanismes cel·lulars com proliferació, supervivència, diferenciació i mort cel·lular. En condicions fisiològiques, participa en processos d'homeòstasi tissular i immunovigilància²³⁷. Davant d'una infecció, es requereix la producció de TNF- α per part dels limfòcits Th1 i els macròfags per oferir una resposta eficaç²³⁸.

Rellevància del TNF- α en el càncer

El TNF- α exerceix un paper dual en el microambient tumoral. D'una banda, pot induir l'apoptosi de les cèl·lules tumorals senyalitzant a través del receptor TNFR1²³⁹. D'altra banda, quan es troba en concentracions elevades, pot actuar com a promotor endogen del creixement, la supervivència i la metàstasi tumoral, senyalitzant a través del receptor TNFR2^{239,240}. S'han quantificat concentracions elevades de TNF- α en el sèrum de pacients amb diferents tipus de càncer, així com un augment de la seva expressió en teixits tumorals^{241,242}. També s'ha observat que aquesta citocina té un efecte directe sobre les cèl·lules endotelials: n'augmenta la permeabilitat facilitant així l'extravasació de les cèl·lules malignes i contribuint a la metàstasi²³⁹. Pel que fa a la metàstasi pleural, experiments amb models murins han demostrat la participació del TNF- α , juntament amb la IL-6 i l'osteopontina, en la formació del VPM activant la senyalització tumoral NF- κ B/STAT3^{37,243,244}. En humans, s'han mesurat concentracions més elevades de TNF- α en VPMs en comparació amb VPBs (parapneumònics o derivats d'IC) com a resultat d'un increment de la producció local en condicions de malignitat, en gran part, pels macròfags pleurals²⁴⁵. Altres autors han quantificat concentracions encara més elevades en VPs derivats de tuberculosi en comparació amb VPMs²⁴⁶.

2.6.2. IFN- γ

L'IFN- γ , també conegut com IFN de tipus II, és una citocina pleiotròpica que juga un paper clau en les respostes antivirals, antitumorals i immunomoduladores. Coordina les funcions del sistema immunitari innat amb les del adaptatiu. És produïda principalment per les cèl·lules NK durant les infeccions i també pels limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺ citotòxics^{214,247,248}. En referència a la immunitat innata, aquesta molècula regula l'expressió de components crítics que participen en la presentació antigènica, com les molècules d'MHC-I i II, i promou la diferenciació dels macròfags cap a un fenotip proinflamatori M1²⁴⁹. En referència a la immunitat adaptativa, l'IFN- γ modula la diferenciació dels limfòcits T cap a un fenotip tipus Th1 al mateix temps que frena la resposta Th2. Estimula el desenvolupament dels limfòcits Tregs i l'activitat citotòxica dels limfòcits T²⁵⁰. Davant d'una infecció viral o bacteriana, activa una cascada inflamatòria per resoldre la infecció evitant però la sobreactivació del sistema immunitari i el dany tissular²¹⁴.

Rellevància de l'IFN- γ en el càncer

Diversos estudis han analitzat el paper d'aquesta citocina en el microambient tumoral, tot i això, les seves funcions en el VPM requereixen ser estudiades amb més detall. Sembla que la concentració d'IFN- γ del microambient tumoral determinarà si exercirà funcions antitumorals o protumorals. Quan els nivells són elevats, és capaç d'induir l'apoptosi de les cèl·lules malignes i millorar l'activitat citotòxica dels limfòcits T CD8⁺. En concentracions baixes, pot afavorir la supervivència de les cèl·lules tumorals circulants i augmentar-ne el potencial metastàtic²¹⁴. En línia amb l'efecte protumoral, estudis recents han vist que pot disminuir l'expressió de les molècules MHC i augmentar l'expressió de PD-L1 facilitant que les cèl·lules tumorals s'escapin del reconeixement i la mort per part dels limfòcits T citotòxics²⁵¹. En condicions de metàstasi pleural derivada de càncer pulmonar, els nivells d'IFN- γ s'associen amb el nombre de limfòcits T CD4⁺/ml del líquid pleural⁹⁷. No s'han observat diferències respecte als nivells d'IFN- γ entre VPMs i VPBs derivats de pacients amb IC. Tot i això, la concentració és molt més elevada en VPs tuberculosos i aporta un valor diagnòstic útil per diferenciar els pacients que presentaven aquest tipus d'exsudat infeccios²⁵².

2.6.3. IL-8

La interleucina-8 (IL-8), també coneguda com CXCL8, és un membre de la família de les quimiocines cisteïna-X-cisteïna (CXC) amb una forta capacitat d'atraure i activar els neutròfils. És secretada principalment pels neutròfils, els macròfags alveolars, les cèl·lules endotelials i els

fibroblasts. També pot ser les cèl·lules tumorals sota certes condicions d'estrès, com la hipòxia, o induïda per factors del microambient tumoral, com el TNF- α i la IL-1 β ²⁵³. Joga un paper clau en la resolució de les infeccions, induint la migració dels granulòcits cap al focus infecció i estimulant-ne la fagocitosi i la NETosi²⁵⁴.

Rellevància de la IL-8 en el càncer

La IL-8 és una de les principals promotores del creixement tumoral en diversos càncers, inclòs el de pulmó²⁵⁵. Té un paper important en l'angiogènesi associada als tumors i afavoreix la migració de les cèl·lules tumorals cap a focus de proliferació secundaris²⁵⁶. A més a més, també recluta cèl·lules immunosupressores cap al microambient tumoral²⁵⁷. S'han detectat concentracions elevades de IL-8 en el plasma de pacients amb diversos tipus de càncers correlacionades amb un mal pronòstic²⁵⁷⁻²⁵⁹. A nivell pleural, la concentració de IL-8 és major en exsudats que en transsudats. Això estaria indicant que prové de la producció local i no de l'augment de la permeabilitat vascular, ja que no s'observa correlació entre els nivells pleurals i plasmàtics en el cas dels exsudats. Tot i el seu poder quimiotàctic, nivells pleurals de IL-8 no es correlacionaven amb el recompte de neutròfils en el VP^{171,173}. Clínicament, s'han associat nivells de IL-8 iguals o per sobre de 1693 pg/ml en líquids pleurals malignes amb una pitjor supervivència global en pacients amb càncer de pulmó²⁶⁰. Evidències experimentals emprant un model murí de mesotelioma van demostrar que el tractament amb anti-IL-8 reduïa la mida del tumor suggerint el potencial d'aquesta molècula com a fre de la progressió d'aquest tipus de càncer²⁶¹.

2.6.4. IL-6

La interleucina-6 (IL-6) és una citocina proinflamatòria que modula una àmplia varietat de processos fisiològics com l'hematopoesi, la reparació tissular i la inflamació²⁶². Actua de nexa d'unió entre la resposta innata i l'adaptativa. Els monòcits, macròfags i les cèl·lules dendrítiques en són els principals productors, però també pot ser secretada per limfòcits B i algunes poblacions de T CD4⁺ en menor proporció^{262,263}. Pel que fa al sistema innat, promou maduració de monòcits cap a macròfags en humans²⁶⁴ i la migració de neutròfils als llocs inflamats en ratolins²⁶⁵. Pel que fa al sistema adaptatiu, promou la supervivència dels limfòcits T CD4⁺ a través de l'activació de proteïnes antiapoptòtiques i limitant l'expressió de Fas. Participa en la diferenciació dels limfòcits T cap a un fenotip Th2, frena la diferenciació cap a Th1 i altera el balanç entre Th17 i Tregs, afavorint la generació de Th17²⁶⁶. També promouen la maduració dels limfòcits B cap a cèl·lules plasmàtiques productores d'anticossos²⁶⁷.

Rellevància de la IL-6 en el càncer

D'acord amb la biologia de la IL-6, aquesta citocina té funcions oposades en el microambient tumoral. Per un costat, estimula la proliferació, la supervivència i la metastasi de les cèl·lules tumorals i al mateix temps suprimeix la resposta immunitària adaptativa. Per altre costat, contribueix al tràfic de limfòcits T cap al tumor, on podran activar-se i exercir les seves funcions citotòxiques efectores²⁶⁸. En particular en els VPs, s'han quantificat nivells significativament més elevats de IL-6 en VPMs en comparació amb VPs transsudats, tot i que els VPs tuberculosos presentaven inclús nivells superiors als del VPM²⁶⁹. Alguns autors reporten la seva utilitat en la discriminació entre exsudats i transsudats, tot i que les cohorts de pacients de l'estudi són reduïdes i possiblement requereixen una validació posterior o ser combinades amb altres biomarcadors que augmentin el seu valor diagnòstic²⁷⁰.

2.6.5. IL-17

La interleucina-17 (IL-17) és una citocina proinflamàtica implicada en la protecció davant de microorganismes patògens, tant extra- com intracel·lulars, i en el desenvolupament de malalties autoimmunes^{271,272}. Els limfòcits Th17 en són els productors principals, tot i això, s'ha vist que altres subpoblacions de cèl·lules T no convencionals, com les $\gamma\delta$ -T i les NKT, i les ILCs en produeixen en resposta a estímuls innats²⁷³. En malalties inflamàtiques, com la diabetis de tipus I, l'esclerosi múltiple o l'artritis psoriàsica, els limfòcits T CD8⁺ també poden secretar IL-17²⁷⁴. Els neutròfils també s'han identificat com a font de IL-17 en lesions psoriàsiques humanes i en models de ratolins amb malalties infeccioses i autoimmunes²⁷⁵. Aquesta citocina té efectes pleiotròpics sobre les cèl·lules del sistema immunitari innat i adaptatiu. Pel que fa al sistema innat, és coneguda per la capacitat d'induir la producció de citocines proinflamàtiques, com la IL-6, el TNF- α , i la IL- β , per part dels macròfags^{272,276}. També promou la migració i l'activitat microbicida dels neutròfils²⁷⁷. Pel que fa al sistema adaptatiu, contribueix en la formació de centres germinals i promou l'activació i la diferenciació dels limfòcits B cap a cèl·lules plasmàtiques productores d'anticossos^{278,279}. Així mateix, també actua sobre els limfòcits T CD4⁺ col·laboradors estimulants la secreció de IL-2, que a la vegada estimula la proliferació dels limfòcits Tregs²⁷⁷.

Rellevància de la IL-17 en el càncer

Diversos estudis han demostrat la participació de la IL-17 en el microambient tumoral afavorint la progressió del càncer. Pot actuar tant de forma directa, estimulant la proliferació i supervivència de les cèl·lules tumorals, com de forma indirecta, promovent l'angiogènesi i reclutant cèl·lules del sistema immunitari, principalment neutròfils i monòcits^{280,281}. Paradoxalment, la IL-17 també té funcions antitumorals. Benchetrit i col·laboradors van demostrar que aquesta citocina era capaç d'inhibir el creixement tumoral en càncers hematopoètics potenciant l'activitat dels limfòcits T citotòxics²⁸². A més a més, la IL-17 pot induir la producció de IL-12 en macròfags, un citocina que potencia l'activitat citotòxica dels limfòcits T i les cèl·lules NK²⁸²⁻²⁸⁴. Clínicament, concentracions sèriques elevades de IL-17 s'associen amb un mal pronòstic en diversos tipus de càncer, inclosos el de pulmó, el colorectal i el de pell²⁸⁵⁻²⁸⁷. A nivell pleural, la concentració de IL-17 és superior en VPMs en comparació amb VPBs. En particular, concentracions per sobre de 15 pg/ml es relacionen amb una baixa supervivència en pacients amb VPM derivat de càncer de pulmó⁷⁴. Dades experimentals de models murins amb VPM mostren que les cèl·lules $\gamma\delta$ -T són unes de les principals productores de IL-17 en el VPM i frenen la progressió del VPM. Els pacients amb freqüències més elevades de cèl·lules $\gamma\delta$ -T productores de IL-17 en el VPM mostraven temps de supervivència més llargs²⁸⁸.

2.6.6. IL-10

La IL-10 és una citocina antiinflamatòria amb un paper clau en la limitació de la resposta immunitària davant de patògens per evitar dany tissular²⁸⁹. Inicialment, es va definir com un producte dels limfòcits Th2, però, avui en dia es coneix que altres subpoblacions de limfòcits T, com els Tregs, i altres cèl·lules del sistema immunitari, com els monòcits, els macròfags, els neutròfils, les cèl·lules dendrítiques i les cèl·lules B també en produeixen. La majoria dels efectes de la IL-10 són supressors. Actua principalment inhibint la transcripció de diverses citocines i quimiocines proinflamatòries i limitant la presentació antigènica als limfòcits T. Recentment, s'ha demostrat que la IL-10 també pot frenar la resposta dels limfòcits T CD4⁺ de forma directa induint anergia i estimular l'activitat dels limfòcits Treg²⁹⁰. A més a més, també promou la diferenciació dels macròfags cap a un subtipus de macròfag M2 antiinflamatori^{291,292}.

Rellevància de la IL-10 en el càncer

Les cèl·lules tumorals també poden produir IL-10 contribuint a generar un microambient tumoral immunosupressor que afavoreix la proliferació i la metastasi del tumor. Estudis previs han quantificat concentracions més elevades d'aquesta citocina en el sèrum de pacients amb diferents tipus de càncer, inclòs el CPCNP, en comparació amb donants sans. Això suggereix que diferents càncers poden adoptar una mateixa estratègia immunosupressora. A més a més, la producció de IL-10 per part de les cèl·lules tumorals s'ha relacionat amb l'agressivitat de l'adenocarcinoma pulmonar²⁹³. Paradoxalment, diversos autors han observat que aquesta citocina pot tenir efectes antitumorals estimulants la proliferació i l'activitat citotòxica dels limfòcits T CD8^{+294,295}. A nivell pleural, la concentració de IL-10 difereix segons l'etiologia del VP, essent major en els VPM en comparació amb els transsudats¹⁷¹. L'augment de la concentració de IL-10 en el líquid pleural respecte al sèrum en pacients amb càncer estaria indicant la producció local d'aquesta citocina. Chen i col·laboradors van descartar la seva utilitat com a biomarcador de pronòstic en pacients amb VPM²⁹⁶. Estudis amb models murins van demostrar que la deficiència d'aquesta citocina limitava la formació del VPM i allargava la vida dels ratolins promovent la diferenciació dels limfòcits T cap a un fenotip Th1 i Th17²⁹⁷.

2.6.7. TGF- β

El TGF- β és una citocina pleiotròpica que regula processos fisiològics claus com la proliferació i la diferenciació cel·lular, la regeneració tissular, i l'homeòstasi. Té un paper immunosupressor sobre el sistema immunitari inhibint la funció de les cèl·lules inflamatòries i promovent la funció dels limfòcits Tregs²⁹⁸. Se'n coneixen tres isoformes amb funcions similars però amb característiques úniques i receptors específics. Les tres isoformes s'expressen a nivell pulmonar en adults²⁹⁹. És sintetitzada i secretada per diverses cèl·lules i components del sistema immunitari, principalment pels macròfags i les plaquetes. Els neutròfils, alguns subtipus de limfòcits, com XX, i la majoria de les cèl·lules neoplàsiques també produeixen TGF- β . Les cèl·lules del sistema immunitari alliberen principalment la isoforma TGF- β 1 que té efectes antiinflamatoris³⁰⁰. Aquesta citocina se secreta en forma de complex latent constituït pel precursor del TGF- β i pel pèptid associat a latència (LAP, de l'anglès *Latency-associated peptide*) units per les proteïnes d'unió al TGF- β latent (LTBPs, de l'anglès *Latent TGF- β binding proteins*). La forma madura i activa és el resultat de l'escissió proteolítica del complex latent i requereix la interacció de les LTBPs amb les integrines de la MEC³⁰¹.

Rellevància del TGF- β en el càncer

El TGF- β no només participa en la regulació de processos fisiològics, sinó que també té un paper fonamental en el desenvolupament del càncer. S'ha descrit que, en estadis inicials de la neoplàsia, estaria exercint un paper supressor sobre el creixement tumoral, mentre que, en estadis més avançats, estaria promovent la progressió del tumor i la metastasi. En pacients amb càncer de pulmó, l'expressió del TGF- β per immunohistoquímica en els limfòcits infiltrats del tumor es relaciona amb una menor supervivència³⁰². A nivell soluble, la concentració de TGF- β és major en el plasma de pacients amb càncer que en individus sans i es correlaciona amb un mal pronòstic³⁰³⁻³⁰⁵. En particular, en el VPM, els TAMs s'han considerat la principal font de TGF- β . Aquesta citocina redueix l'activitat citotòxica dels limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺ i converteix les cèl·lules presentadores d'antígens en cèl·lules tolerogèniques¹³⁷. En el cas del VPM derivat de mesotelioma, els nivells de TGF- β s'associen directament amb l'estadi de la malaltia, la mida del tumor i un pitjor pronòstic³⁰⁶.

2.6.8. VEGF

El VEGF és un dels factors angiogènics més potents que es coneix i està produït per les cèl·lules endotelials, els macròfags, els limfòcits T activats, les plaquetes i les cèl·lules tumorals. Estudis *in vitro* han demostrat que el VEGF estimula la proliferació i la migració de les cèl·lules endotelials, preveu que entrin en apoptosi i augmenta la permeabilitat vascular^{307,308}. En condicions fisiològiques, l'angiogènesi és necessària per a la formació dels òrgans durant el desenvolupament embrionari i també per a la cicatrització de ferides en adults. No obstant això, també té un paper clau en patologies com el càncer, l'artritis reumatoide i la psoriasis³⁰⁹. S'han descrit 4 isoformes del VEGF reconegudes específicament per un o més d'un receptor (VEGFR1,-2 i -3)³¹⁰.

Rellevància del VEGF en el càncer

La funció del VEGF no es limita únicament a les cèl·lules endotelials sinó que també pot afectar la funció de les cèl·lules del sistema immunitari que es troben en el microambient tumoral. Per un costat, inhibeix la maduració de les cèl·lules dendrítiques, fet que comporta la inactivació dels limfòcits T citotòxics³¹¹ i, per l'altre, estimula els limfòcits Tregs, els TAMs i les MDSCs, exercint així un efecte immunosupressor³¹². Clínicament, nivells elevats de VEGF en el sèrum s'associen amb la progressió tumoral i un mal pronòstic en alguns càncers, inclòs el càncer de pulmó. Evidències recents indicarien que les plaquetes són una de les fonts principals de VEGF

circulant i que la seva endocitosis podria explicar la major càrrega de VEGF de les plaquetes en pacients amb càncer³¹³. A nivell pleural, les cèl·lules tumorals secreten VEGF que contribueix a la formació del VPM i al creixement maligne. Els resultats d'un metaestudi van suggerir que la determinació del VEGF pleural millora la precisió diagnòstica del VPM, amb una sensibilitat del 75% i una especificitat del 72%^{314,315}. Altres autors han proposat la mesura del VEGF en el VPM com a factor indicatiu de baixa supervivència en pacients amb càncer de pulmó metastàtic²⁶⁰.

2.6.9. PF4

El factor plaquetari IV (PF4), també anomenat CXCL4, és una de les proteïnes més abundants dels grànuls α de les plaquetes i s'allibera en grans quantitats quan aquestes s'activen³¹⁶. A banda d'unir-se a l'heparina i promoure la coagulació, també té efectes pleiotròpics sobre les cèl·lules del sistema immunitari. Pel que fa al sistema innat, activa la desgranulació dels neutròfils i la seva adhesió a les cèl·lules endotelials. També preveu l'apoptosi dels monòcits, indueix la seva diferenciació cap a macròfags i promou la fagocitosis i la producció de ROS³¹⁷. Pel que fa al sistema adaptatiu, inhibeix la proliferació dels limfòcits T i la seva producció d'IFN- γ i IL-2 mentre estimula la proliferació dels limfòcits Tregs^{318,319}. Diversos estudis descriuen que pot interaccionar amb altres quimiocines, com la IL-8 o CCL5, o factors de creixement, com el VEGF, i modular-ne les seves funcions^{320,321}. Amb el temps, s'han identificat diversos receptors que reconeixen el PF4. D'una banda, Lasagni i col·laboradors van trobar que es podia unir al CXCR3-B expressant en la superfície de les cèl·lules endotelials i els limfòcits T^{322,323}. Estudis recents evidencien que el PF4 també podria ser un lligand per la integrina Mac-1 expressada en la superfície dels neutròfils, monòcits i macròfags³²⁴.

Rellevància del PF4 en el càncer

Originàriament, es va descobrir que el PF4 inhibia l'angiogènesi i el creixement tumoral en ratolins i en línies cel·lulars de mieloma múltiple³²⁵⁻³²⁷. No obstant això, en un estudi posterior, fet també amb ratolins, es va demostrar que el PF4 induïa l'acumulació de plaquetes en el tumor i que, a més a més, promovia el creixement tumoral³²⁸. En humans, la concentració de PF4 de les plaquetes de pacients amb càncer és major que en donants sans³²⁹. En pacients amb adenocarcinoma pulmonar, la sobreexpressió de PF4 (a nivell de mRNA) en el tumor en el moment del diagnòstic s'associa amb un mal pronòstic³²⁸. En línia amb aquests resultats, en aquesta tesi s'ha demostrat l'efecte protumoral del PF4 disminuint la capacitat citotòxica dels limfòcits T en el context metastàtic del VPM. Concentracions elevades de PF4 en el VPM derivat de pacients amb adenocarcinoma pulmonar s'han associat a un mal pronòstic. En

pacients amb mesotelioma, la concentració de PF4 del líquid pleural també s'ha considerat un factor independent associat a un mal pronòstic³³⁰. Aquest últim estudi, juntament amb els articles d'aquesta tesi (article 1.1 i article 1.2), obren portes a futures investigacions sobre el paper immunosupressor del PF4 en el VPM.

2.6.10. P-selectina

La P-selectina, també anomenada CD62P, és una proteïna transmembrana que s'emmagatzema en els grànuls α de les plaquetes, així com en els cossos de Weibel-Palade de les cèl·lules endotelials³³¹. Quan la plaqueta s'activa, la P-selectina es transloca ràpidament a la superfície i interacciona amb el PSGL-1 expressat en els leucòcits, les cèl·lules endotelials i altres plaquetes¹⁷⁵. La unió de les plaquetes a les cèl·lules de la immunitat innata ocorre principalment en neutròfils i monòcits. Aquesta unió té conseqüències bidireccionals: d'una banda, la plaqueta activada induïx l'activació d'aquestes cèl·lules innates i aquestes, a la vegada, són capaces d'incrementar l'estat d'activació de les plaquetes unides¹⁸³. En concret, la interacció de la P-selectina amb el PSGL-1 dels neutròfils promou la formació de NETs³³² i quan interacciona amb els monòcits n'estimula el seu paper en la reparació de tissular³³³. En general, la interacció dels leucòcits amb la plaqueta els fa més susceptibles a adherir-se a l'endoteli activat i migrar cap als teixits inflamats^{334,335}. La P-selectina també es pot trobar en forma soluble en circulació. Diversos estudis suggereixen que després d'expressar-se en la superfície de la plaqueta, s'elimina per escissió. En altres casos, s'ha vist que pot derivar de l'empalmament (*splicing*, en anglès) alternatiu del RNAm que genera una isoforma de P-selectina que no presenta el domini transmembrana³³⁶.

Rellevància de la P-selectina en el càncer

La P-selectina participa en la progressió tumoral promovent l'adhesió de les cèl·lules malignes circulants a la plaqueta i a l'endoteli activat, facilitant així la metàstasi. S'ha observat una expressió elevada de P-selectina en la vasculatura de diversos càncers, inclosos el de pulmó i mama³³⁷. Experiments amb ratolins mostren que la deficiència de P-selectina alenteix el creixement tumoral i limita la metàstasi pulmonar³³⁸. En humans, Roselli i col·laboradors han mesurat concentracions més elevades de P-selectina en el plasma de pacients amb càncer de pulmó escamós respecte els controls sans. En particular, concentracions elevades de P-selectina s'associaven a estadis avançats del càncer³³⁹. En línia amb aquestes dades, també s'han detectat concentracions més elevades de P-selectina en el plasma de pacients amb càncer d'ovari³⁴⁰. La informació disponible sobre la P-selectina en el VPM és pràcticament

inexistent. Donada la rellevància de les plaquetes en la progressió tumoral i la manca d'estudis centrats en la P-selectina en el VPM, l'hem valorat en els articles presentats en aquesta tesi.

2.6.11. CD40L

El lligand de CD40 (CD40L) és una proteïna transmembrana que participa en la modulació de la resposta immunitària. No és exclusiva de la plaqueta, sinó que es va identificar originàriament en els limfòcits T CD4⁺ estimulats. Igual que la P-selectina, n'existeix també una forma soluble (sCD40L) i, en aquest cas, la plaqueta n'és la principal font³⁴¹. El seu receptor és el CD40 i s'expressa en limfòcits B, fibroblasts, cèl·lules endotelials, neutròfils, monòcits, cèl·lules dendrítiques, macròfags, així com en la pròpia plaqueta³⁴¹⁻³⁴³. Donada la seva àmplia expressió, el CD40L participa en múltiples processos immunitaris; inclosos la formació de centres germinals, la supervivència dels limfòcits B i la millora de la capacitat de presentació antigènica de les cèl·lules dendrítiques³⁴⁴. També promou l'alliberació de NETs per part dels neutròfils i la producció de ROS i citocines proinflamatòries per part dels neutròfils i els monòcits^{345,346}.

Rellevància del CD40L en el càncer

S'ha descrit que el CD40L contribueix a generar un microambient tumoral immunosupressor. Schlom i col·laboradors proposen diversos mecanismes pels quals la interacció CD40-CD40L podria estar limitant la resposta immunitària. En primer lloc, el sCD40L promou l'expansió de les MDSCs mentre inhibeix la proliferació dels limfòcits T i la seva producció d'IFN- γ . En segon lloc, l'addició de sCD40L també estimula l'expansió de limfòcits Tregs³⁴⁷. A nivell sistèmic, la concentració sèrica de sCD40L era més elevada en pacients amb càncers respecte a donants sans^{348,349}. En VPMs derivats de pacients amb càncer de pulmó, concentracions elevades del receptor soluble del CD40L s'han associat amb un pitjor pronòstic⁷⁵.

2.6.12. PD-L1

El PD-L1 és una proteïna transmembrana que actua com a receptor coinhibidor (o molècula inhibidora dels punts de control immunitari) i, per tant, té un paper clau en el manteniment de l'homeòstasi immunitària. S'expressa principalment a la superfície de les cèl·lules presentadores d'antígens (macròfags i cèl·lules dendrítiques) i de les cèl·lules tumorals³⁵⁰. També pot ser expressat per les plaquetes, les PMPs, els neutròfils i els limfòcits, tot i que en nivells menors^{351,352}. El seu receptor és el PD-1 pot ser expressat principalment pels limfòcits T,

però també el podem trobar expressat en limfòcits B i monòcits³⁵³. La interacció PD-1/PD-L1 limita l'activació excessiva dels limfòcits T en condicions d'inflamació. En un estudi recent, s'ha observat que l'expressió de PD-L1 en neutròfils els retardava l'apoptosi³⁵⁴. El PD-L1 també es pot trobar soluble en circulació. Aquesta forma soluble es pot originar per 2 mecanismes: 1) l'escissió del domini extracel·lular per part de metal·loproteïnases o 2) l'empalmament alternatiu generant una isoforma de PD-L1 que no presenta el domini transmembrana³⁵⁰.

Rellevància del PD-L1 en el càncer

El PD-L1 actua com a modulador negatiu de la immunitat antitumoral. En pacients amb CPCNP avançat, el PD-L1 pot expressar-se de forma constitutiva a la superfície de diferents poblacions leucocitàries^{355,356}. S'han observat freqüències més elevades de leucòcits i plaquetes PD-L1⁺ circulants en pacients amb CPCNP respecte donants sans³⁵¹. L'expressió de PD-L1 en les cèl·lules tumorals i les cèl·lules immunitàries infiltrants al tumor s'ha relacionat amb una major eficàcia de les teràpies basades en el bloqueig de la interacció PD-1/PD-L1 en diferents càncers, inclosos el de pulmó. En el microambient tumoral, els neutròfils i macròfags que expressen PD-L1 són capaços de limitar la resposta citotòxica dels limfòcits T interaccionant amb el PD-1 de la seva superfície^{357,358}. D'altra banda, l'IFN- γ produït pels limfòcits T CD8⁺ o els TAMs és capaç d'induir l'expressió de PD-L1 en cèl·lules tumorals^{359,360}. Clínicament, els nivells plasmàtics de PD-L1 soluble, previs al tractament amb immunoteràpia, s'han associat amb la progressió del cancer³⁶¹. L'expressió de PD-L1 en tumors també s'ha relacionat amb un mal pronòstic en pacients amb diferents tipus de càncer. A nivell pleural, Ghanim i col·laboradors van observar que l'expressió de PD-L1 en les biòpsies pleurals de pacients amb VPM s'associava a una esperança de vida reduïda³⁶².

3. HIPÒTESI I OBJECTIUS

3.1. HIPÒTESI

L'aparició d'un VP d'origen maligne reflecteix en la majoria dels casos l'estat avançat d'un càncer i un auguri de mal pronòstic. Aprofitant que els líquids pleurals es drenen de forma rutinària, representen una opció atractiva per estudiar els mecanismes immunològics implicats en la formació del VPM i les interaccions entre les cèl·lules tumorals i les cèl·lules del sistema immunitari.

La hipòtesi de partida és que hi hauria un augment de la concentració de factors antiinflamatoris en el VPM que estarien generant un microambient tumoral immunosupressor. Donada la rellevància de la plaqueta en la progressió tumoral i en la modulació del sistema immunitari, és possible observar un increment de factors plaquetaris, reflex d'una major activació de la plaqueta contribuint així a la immunosupressió. També, i d'acord amb aquesta hipòtesi, en aquest microambient tumoral: a) els macròfags adquiririen un fenotip protumoral secretant molècules que afavorissin la progressió del tumor; b) les funcions del neutròfil es veurien alterades, mostrant una predisposició a la formació de NETs que contribuirien al creixement del tumor; c) els limfòcits T CD8⁺ disminuirien la seva capacitat citotòxica contra les cèl·lules tumorals. En aquest context, s'espera identificar factors solubles implicats en la modulació de la resposta immunitària en el VPM i avaluar la seva utilitat com a biomarcadors de diagnòstic i/o pronòstic.

3.2. OBJECTIUS

General

Caracteritzar a nivell cel·lular, molecular i funcional els VPMs metastàtics de pacients amb adenocarcinoma pulmonar com a tumor primari. En concret, s'espera identificar molècules immunomoduladores funcionalment rellevants en VPM que puguin ser útils com a biomarcador de diagnòstic i/o pronòstic. D'aquesta manera, es pretén millorar el coneixement del paper del sistema immunitari en el microambient tumoral del VPM.

Específics

1. Identificar les principals poblacions leucocitàries del VPM de pacients amb adenocarcinoma pulmonar i caracteritzar-ne el fenotip. Es compararà amb les poblacions del VPB de pacients amb IC com a grup control.
2. Analitzar la composició molecular dels VPMs de pacients amb adenocarcinoma pulmonar i determinar-ne la concentració dels factors solubles immunomoduladors, en especial, aquells derivats de la plaqueta. Es compararà amb la composició molecular del VPB de pacients amb IC com a grup control.
3. Estudiar l'efecte del VPM de pacients amb adenocarcinoma pulmonar sobre la resposta del sistema immunitari:
 - a. Comparar l'efecte del VPM amb el del VPB de pacients amb IC sobre les funcions dels limfòcits T, incloses l'activació, la proliferació, la capacitat citotòxica i la producció de citocines.
 - b. Comparar l'efecte del VPM amb el del VPB de pacients amb IC sobre les funcions dels neutròfils, incloses la desgranulació, la NETosi, l'esclat oxidatiu i l'apoptosi.
4. Relacionar la concentració dels factors solubles immunomoduladors dels VPs amb les funcions dels limfòcits T i dels neutròfils.
5. Analitzar l'origen dels factors solubles que presentaven una concentració alterada en el VPM i es relacionaven amb les funcions dels limfòcits T.
6. Determinar el valor diagnòstic i/o pronòstic dels factors solubles immunomoduladors alterats en el VPM i de les funcions dels limfòcits T i dels neutròfils.

4. PUBLICACIONES

4.1. ARTICLE 1.1

Platelet factor 4 regulates T cell effector functions in malignant pleural effusions

Maria Mulet, Carlos Zamora, José M Porcel, Juan C Nieto, Virginia Pajares, Ana M Muñoz-Fernandez, Núria Calvo, Aureli Esquerda, Silvia Vidal

Cancer Letters. 2020 Oct; 28(491):78-86.



Platelet factor 4 regulates T cell effector functions in malignant pleural effusions



Maria Mulet^{a,1}, Carlos Zamora^{a,1}, José M. Porcel^b, Juan C. Nieto^a, Virginia Pajares^c, Ana M. Muñoz-Fernandez^c, Nuria Calvo^d, Aureli Esquerda^e, Silvia Vidal^{a,*}

^a Department Immunology, Institut Recerca Hospital de La Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

^b Pleural Medicine Unit, Department of Internal Medicine, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, IRBLleida, University of Lleida, Lleida, Spain

^c Department Pneumology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

^d Department Oncology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

^e Department of Laboratory Medicine, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, IRBLleida, University of Lleida, Lleida, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

MPE
Lung cancer
Platelet-derived soluble factors
PF4
T lymphocytes
Immunosuppression

ABSTRACT

Malignant pleural effusion (MPE) is defined as the presence of tumor cells in pleural fluid and it is a fatal complication of advanced lung adenocarcinoma (LAC). To understand the immune response to the tumor in MPE, we compared the concentration of immunomodulatory factors in MPE of LAC and pleural effusion of heart failure (HF) patients by ELISA, and the proliferation and cytotoxic phenotype of T cells stimulated in the presence of LAC and HF pleural fluids by cytometry. Platelet factor 4 (PF4), vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor beta (TGF- β) and P-selectin levels were higher in LAC than in HF pleural fluids. However, plasmatic PF4 and P-selectin levels were similar in LAC and HF. VEGF positively correlated with TGF- β and sPD-L1 in LAC but not in HF pleural fluids. LAC pleural fluids also inhibited T lymphocyte proliferation and cytotoxicity and reduced IL-17 production. PF4 levels inversely correlated with T cell function. The high content of PF4 in MPE was associated with poor prognosis. Our findings suggest that an impaired response of T lymphocytes induced by PF4 provides a significant advantage for tumor progression.

1. Introduction

Lung cancer remains one of the leading causes of death worldwide. Particularly, adenocarcinoma is the most prevalent histological subtype and it frequently metastasizes to the pleura in advanced stages [1,2]. In healthy lungs, there is a small amount of fluid in the pleural space to prevent friction between the lung and the chest wall [3]. However, various pathologic conditions, such as infections or malignancies, can create an imbalance between pleural fluid formation and absorption, giving rise to pleural effusion [4]. The presence of cancerous cells in the fluid is the gold standard for diagnosing a malignant pleural effusion (MPE), commonly associated with a poor prognosis [5].

Since pleural fluid contains living tumor cells and leukocytes in suspension, it represents a useful model for studying local immune response in the tumor microenvironment (TME). Tumor cells metastasize to the pleural cavity [5] and immunological cells in MPE may be resident and proliferate or they may migrate from peripheral blood [6,7].

In MPE, tumor cells must employ several strategies to evade the

patient's immune system. These include the production of anti-inflammatory factors such as IL-10, TGF- β and VEGF, and chemokines that will recruit regulatory T cells (Tregs), macrophages and myeloid-derived suppressor cells that will also support tumor progression [8–10]. Platelet-secreted factors can also contribute by promoting tumor cell proliferation to assemble micrometastatic foci. Among the soluble factors released by platelets, VEGF and TGF- β , and regulatory mediators like platelet factor 4 (PF4, also called CXCL4) can modulate cancer outgrowth [11].

T lymphocytes represent the most potent anti-tumor effector cells dampening tumor progression. In particular, activated CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes eliminate malignant cells mainly through the exocytosis of preformed granules containing granzymes and perforin [12]. Some authors have also described the existence of a cytotoxic subset of CD4⁺ T lymphocytes that secrete these cytotoxic granules [13]. Prior studies have demonstrated a strong link between tumor progression and an impaired T lymphocyte function. In a MPE context, CD8⁺ T lymphocytes expressed an exhausted phenotype likely induced by a prolonged

* Corresponding author.

E-mail address: svidal@santpau.cat (S. Vidal).

¹ These authors contribute equally.

List of abbreviations

CFSE	Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FSC	Forward-Scattered
HF	Heart Failure
iMFI	integrated Mean Fluorescence Intensity
LAC	Lung Adenocarcinoma
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MPE	Malignant Pleural Effusion

NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear cells
PF4	Platelet Factor 4
PMPs	Platelet-derived microparticles
SSC	Side-Scattered
SPD-L1	Soluble Programmed Cell Death Ligand 1
TGF-β	Transforming Grow Factor Beta
TME	Tumor Microenvironment
Tregs	Regulatory T cells
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

exposure to tumor antigens [14,15]. Prado-Garcia et al. described an impaired production of cytotoxic granules in the CD8⁺ T cells of pleural effusions from lung adenocarcinoma (LAC) patients [16]. Later studies also revealed a reduced granzyme B expression in the T lymphocytes of MPE from lung cancer patients [17]. However, it is not entirely clear whether the T lymphocytes present in MPE display phenotypic alterations *per se* or whether the T function impairment is a consequence of the influence of soluble pleural fluid components.

Our primary objective was to study the factors inducing the modulation of T lymphocyte functions in MPE, specifically proliferation, cytotoxicity and cytokine production. With this purpose, we characterized the altered presence of immunomodulatory soluble factors and their association with T cell function impairment and clinical outcomes. In addition, the evaluation of the prognostic role of soluble immunomodulatory factors of pleural fluid from LAC patients will be clinically relevant.

2. Materials and methods

2.1. Pleural fluid sample collection and processing

Pleural fluid samples were obtained from 35 lung adenocarcinoma patients (LAC) and 20 heart failure (HF) patients (as non-malignant control group) from Hospital Universitari Arnau de Vilanova (Lleida) and Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona). Malignancy was based on the detection of tumor cells by pleural fluid cytologic analysis. Samples were then 40- μ m filtered before spinning down the cellular pellet. Cell-free pleural fluids were again 0.22- μ m filtered and stored at –80 °C until use.

Written informed consent was obtained from all patients and donors and samples were anonymized. Ethical approval of the study was granted by the Institutional Ethics Committee of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. The clinical profile of patients and the biochemical characteristics, obtained from the routine clinical analysis, are summarized in Table 1.

2.2. Isolation of peripheral blood mononuclear cells from healthy donors

Venous blood samples were obtained from 15 healthy donors from the blood bank of Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and collected in heparin-coated tubes (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA). Immediately, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated as previously described [18].

2.3. *In vitro* culture of peripheral blood mononuclear cells

2.3.1. CFSE staining

To determine T cell proliferation, PBMCs were adjusted to 10⁷ cells/ml, labeled with 10 μ M of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (Sigma, S. Louis, Missouri) and analyzed as previously described [6].

2.3.2. Culture of PBMCs in the presence of conditioned medium with pleural fluids or recombinant human PF4

CFSE-labeled PBMCs were cultured in RPMI medium supplemented with 50% of pleural fluid from LAC or HF patients or recombinant human PF4 (rhPF4) (2.5 μ g/ml) for 72 h at 37 °C in 5% of CO₂ [19]. T lymphocytes were stimulated with a suboptimal T cell activation/expansion kit containing anti-CD3, -CD2 and -CD28 (called anti-CD3 cocktail beads) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). In order to have a positive control of activation and proliferation, cells were also cultured in the presence of 50% of fetal calf serum (FCS). Cells were subsequently stained with monoclonal antibodies and analyzed by flow

Table 1

Clinical profile and characteristics of HF and LAC patients included in the study.

	LAC	HF	p-value
Patients, n	35	20	
Median age (range), years	67 (61–75.75)	84.5 (80.5–87.25)	< 0.0001
Male/female	27/8	14/6	n.s.
Lactate dehydrogenase (U/L)	768.9 \pm 79.43	174.1 \pm 12.13	< 0.0001
Total protein (g/dL)	4.37 \pm 0.19	2.50 \pm 0.16	< 0.0001
Glucose (mg/L)	103 (83–160)	132.5 (103.3–156)	n.s.
C-reactive protein (mg/L)	10.6 (6.3–27.6)	5 (2.85–11.9)	n.s.
Adenosine Deaminase (U/L)	7.2 (4.9–11)	4.8 (3.3–7.55)	< 0.05
pH	7.38 \pm 0.02	7.47 \pm 0.01	< 0.001
Median (IQR) survival time from diagnosis, days	235 (78.5–552)		
EGFR mutations	6/25	NA	
ALK translocations	2/25	NA	
Treatment			
Chemotherapy	10/25	NA	
EGFR inhibitors	2/25	NA	
Her2 inhibitors	2/25	NA	
ALK inhibitors	2/25	NA	
Immunotherapy	6/25	NA	
Radiotherapy	2/25	NA	
Surgery	1/25	NA	
Relative pleural fluid composition (%)			
T lymphocytes/leukocytes	62.22 \pm 5.56	64.73 \pm 9.29	n.s.
CD4 ⁺ T cells/lymphocytes ^a	63.03 (50.21–67.55)	63.06 (52.08–73.78)	n.s.
CD8 ⁺ T cells/lymphocytes ^a	23.52 (17.86–29.97)	18.5 (12.11–24.96)	n.s.
Neutrophils/leukocytes	1.26 (0.35–3.02)	2.54 (0.93–6.81)	n.s.
CD14 ⁺ monocytes/leukocytes	10.3 (1.13–26.5)	25.27 (10.72–51)	n.s.
Pleural fluid T cell composition (cell/ml)^a			
CD4 ⁺ T cell (cell/mL)	1.2 \cdot 10 ⁵ (4.5 \cdot 10 ⁴ –1.6 \cdot 10 ⁵)	4.3 \cdot 10 ⁴ (1.9–8.2 \cdot 10 ⁴)	0.077
CD8 ⁺ T cell (cell/mL)	3.8 \cdot 10 ⁴ (1.4–6.2 \cdot 10 ⁴)	1.2 \cdot 10 ⁴ (4.3 \cdot 10 ³ –3.8 \cdot 10 ⁴)	0.035

ALK: anaplastic lymphoma kinase; EGFR: epidermal growth factor receptor; HF, heart failure; LAC, lung adenocarcinoma; NA, not applicable; NS, non-significant.

^a These data were obtained from a previous publication (n = 22 LAC and n = 10 HF) [6].

cytometry. Culture supernatants were kept at -20°C until use.

2.4. Cell staining for flow cytometry

Pleural fluid cells were stained as previously described [6] with Panel A: CD45-PE, CD20-FITC (Immunotools, Fiesoythe, Germany), CD3-PECy5, CD4-PECy7 (BioLegend, San Diego, CA, USA); Panel B: anti-CD45-VioBlue (Miltenyi Biotec), CD3-PECy5, CD14-APC, CD16-FITC and CD56-PE (Immunotools).

Stimulated PBMCs were collected by centrifugation, surface stained with anti-CD4-PECy7, anti-CD8-PerCP (BioLegend) and anti-CD25-PE (BD Biosciences, San Jose, USA). For intracellular staining, we used Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit (BD Biosciences) and cells were labeled with anti-granzyme B-PE (eBioscience, San Diego, CA, USA) and anti-perforin-APC (BioLegend).

After staining, cells were acquired in MACSQuant cytometer (Miltenyi Biotec). Cellular viability was assessed by flow cytometry using the LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). For each marker, the percentages of positive cells (% cells), the mean fluorescence intensity (MFI) and integrated mean fluorescence intensity (iMFI; calculated by multiplying the percentage of positive cells by MFI) were determined using MACSQuantify™ Software.

2.5. Concentration of soluble mediators in pleural fluid and culture supernatants

All cytokines were quantified with the standard curves provided by the corresponding ELISA kit. Cytokine levels of PF4 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), TGF- β 1 (Mabtech, Sweden), VEGF (Peprotech), P-selectin (R&D Systems, MN, USA), and soluble PD-L1 (Thermo Fisher Scientific, Vienna, Austria) were measured in pleural fluid. Levels of IFN- γ (BD Biosciences), IL-17 (Peprotech) and IL-10 (Immunotools) were measured in the pleural fluids and supernatants.

2.6. Statistics

Normal data distribution was assessed by the Kolmogorov-Smirnov test. Variables were presented as mean \pm SEM or median (interquartile range-IQR-) according to normal or non-normal distribution respectively. Data was compared by Mann-Whitney test or Wilcoxon test. Correlations were determined by the Spearman test or Pearson test. P-values < 0.05 were considered statistically significant. Correlation matrixes were drawn employing an R package called “corrplot” [20]. The association between the soluble factors of LAC pleural fluids and overall survival was estimated using the Kaplan-Meier method and analyzed using the log-rank test. Overall survival was measured from the date of MPE diagnosis to the date of the last follow-up or death. Statistical differences between short-term mortality were analyzed by the Fisher test.

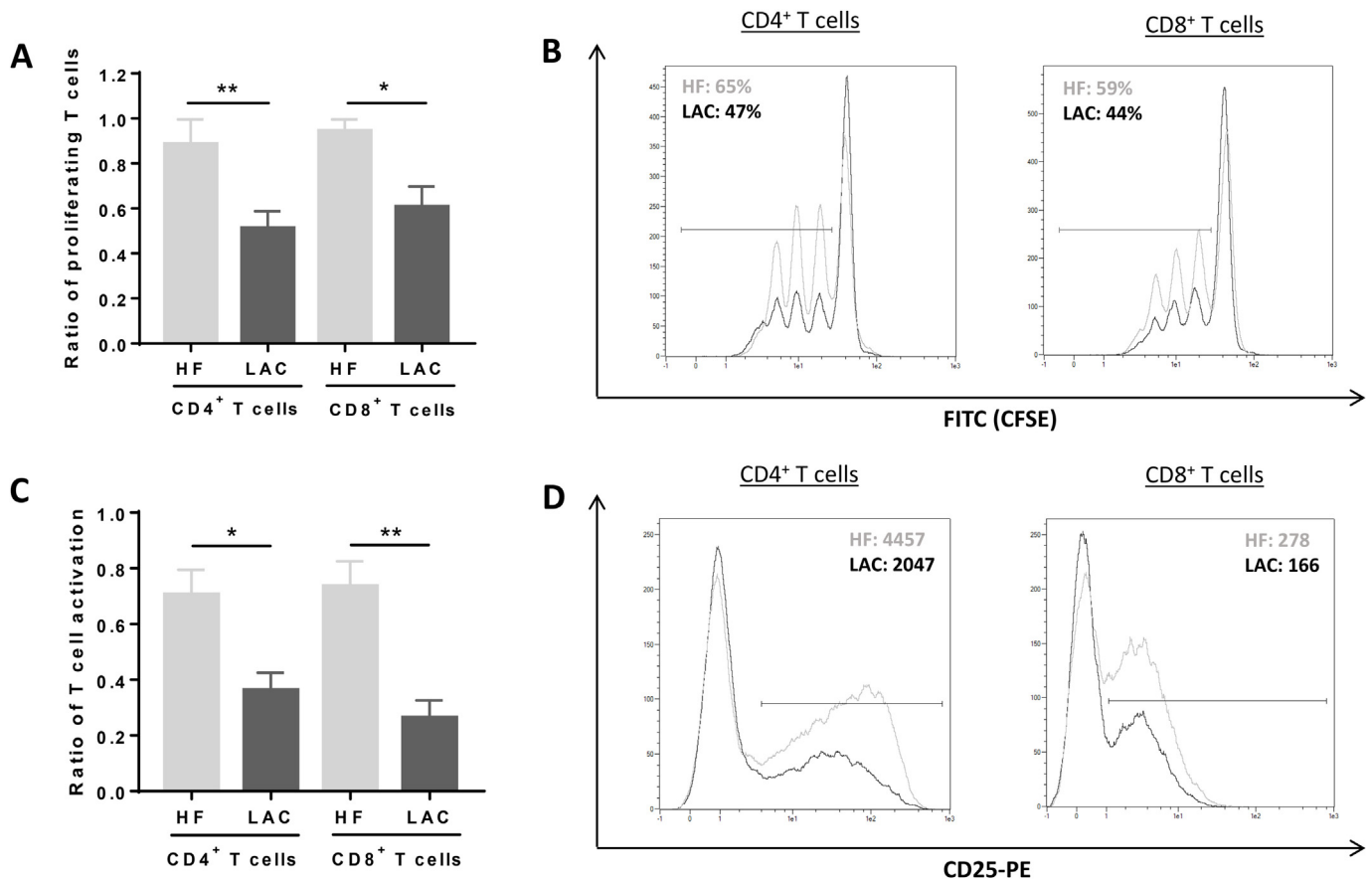


Fig. 1. Effect of pleural fluid from HF and LAC patients on T cell activation. CFSE-stained PBMCs were stimulated with anti-CD3 cocktail beads in the presence of pleural fluid from HF or LAC patients or FCS (as a positive control) for 72 h. Comparison between ratios of (A) proliferating and (C) activated CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes cultured with HF (n = 7) and LAC (n = 14) is shown. Ratios were calculated dividing LAC or HF values by FCS values. Representative overlapping histogram plots of (B) proliferation and (D) activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells obtained by flow cytometry are depicted. The grey line refers to HF cultures and the black one to LAC cultures. Percentages of proliferating cells and iMFI (CD25) values are shown in the images. Error bars correspond to SEM. Statistical differences were analyzed by the Mann-Whitney test, *p < 0.05 and **p < 0.01. HF, heart failure patients; iMFI, integrated mean fluorescence intensity; LAC, lung adenocarcinoma patients.

3. Results

3.1. Effect of cell-free pleural fluids on T lymphocyte effector functions

We found that both CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes stimulated with anti-CD3 cocktail beads in the presence of LAC pleural fluids had a significantly reduced proliferation, measured by CFSE, and a lower activated phenotype, measured by CD25 expression, when compared to those stimulated in the presence of HF pleural fluids (Fig. 1). Proliferating T lymphocytes cultured with LAC pleural fluids had a significantly lower granzyme B expression compared to those cultured with HF pleural fluids (Fig. 2A and B). There were no significant differences in the granzyme B expression of non-proliferating T lymphocytes from LAC and HF pleural fluids (data not shown). Perforin expression was also comparable in HF and LAC pleural fluid cultures (data not shown). We found that the levels of IL-17 were significantly lower in LAC than in HF pleural fluid cultures (Fig. 2C). The IFN- γ levels in the culture supernatant tended to be lower in the presence of LAC than in the presence of HF pleural fluids and the IL-10 levels tended to be higher in LAC than in HF pleural fluid cultures (Fig. 2D and E).

3.2. Immunomodulatory soluble factors in MPE

To characterize the soluble factors in the pleural fluids of LAC patients, we quantified IL-10, VEGF, TGF- β and sPD-L1 and other immunomodulatory molecules produced mainly by platelets such as PF4 and P-selectin. The levels of TGF- β , VEGF, PF4 and P-selectin were

significantly higher in LAC than in HF pleural fluids (Fig. 3A–D). As we observed in a previous paper, the levels of IL-10 tended to be higher in LAC than in HF pleural fluids [6] while levels of sPD-L1 were comparable in both groups (data not shown).

A strong positive correlation was observed between the levels of VEGF and P-selectin, and sPD-L1 in LAC pleural fluids (Fig. 4A, Supplementary Fig. 1). We also observed a positive correlation between P-selectin and TGF- β in both LAC and HF pleural fluids. We found a strong positive correlation between TGF- β and PF4 levels and a negative correlation between VEGF and P-selectin in the pleural fluids of HF patients (Fig. 4B, Supplementary Fig. 1).

3.3. Association of soluble factors and lymphocyte function impairment in pleural fluids

PF4 levels do not correlate with either CD4⁺ or CD8⁺ T cells in LAC pleural fluids (neither in absolute nor in relative numbers) (Fig. 1C and D in Data in Brief). However, PF4 levels were negatively correlated with T cell proliferation and activation (Fig. 5A–B, D–E) and granzyme B expression (Fig. 5C, F) in the cultures with LAC pleural fluids. Moreover, the levels of sPD-L1 also correlated with CD4⁺ T cell proliferation and activation (Fig. 5G and H). There were no correlations between sPD-L1 and CD8⁺ T cell proliferation and activation nor correlations between other platelet-derived factors (P-selectin, TGF- β and VEGF) and CD4⁺ and CD8⁺ T proliferation (Fig. 2 in Data in Brief) and granzyme B expression (Fig. 3 in Data in Brief).

To analyze the source of the increased pleural fluid molecules in

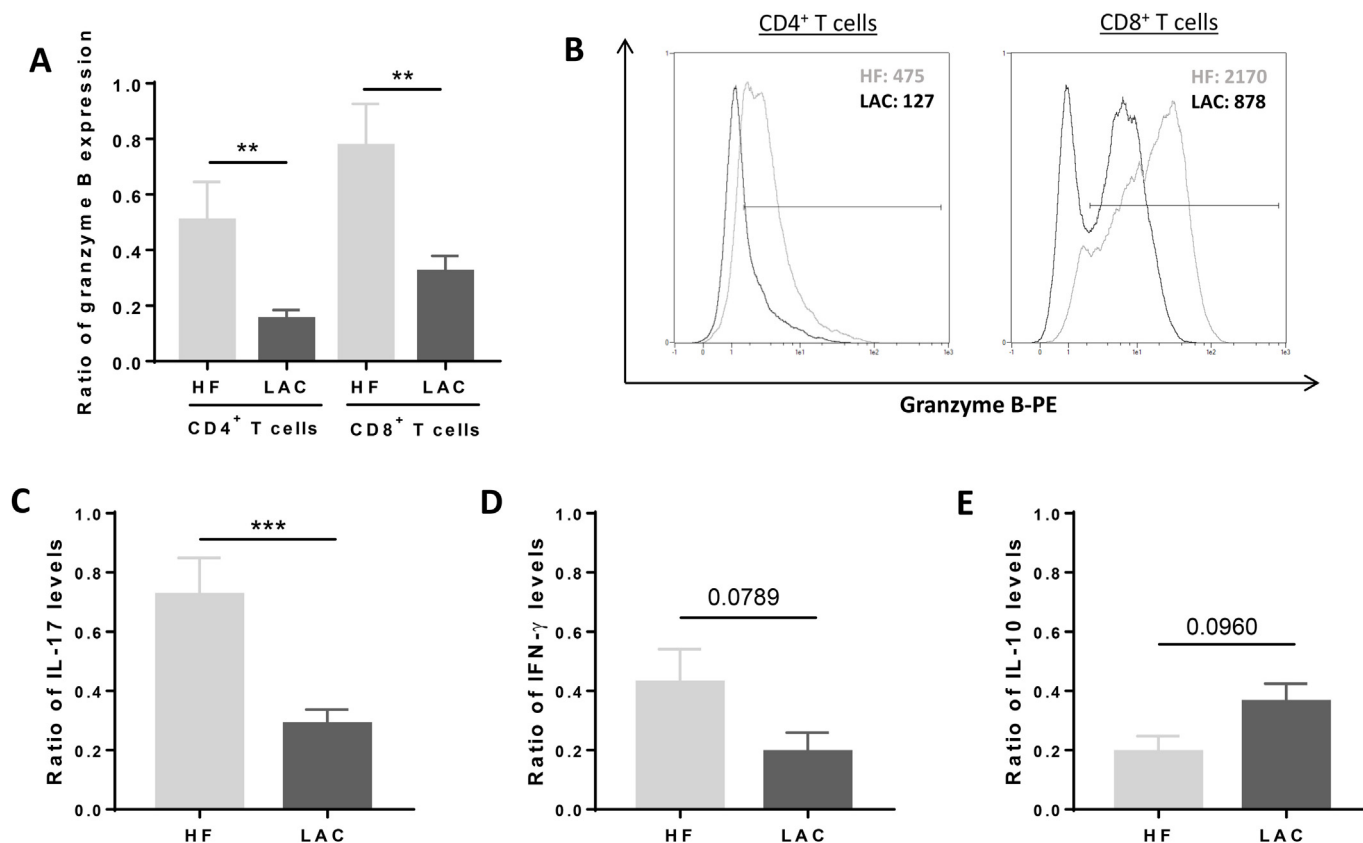


Fig. 2. Effect of pleural fluid from HF and LAC patients on T cell effector functions. CFSE-stained PBMCs were stimulated with anti-CD3 cocktail beads in the presence of pleural fluid from HF or LAC patients or FCS (as a positive control) for 72 h. (A) Comparison between ratios of granzyme B expression (iMFI) in T lymphocytes cultured with HF (n = 7) and LAC (n = 14). (B) Representative overlapping histogram plots of granzyme B expression in T lymphocytes obtained by flow cytometry. iMFI values are shown in the images. The grey line refers to HF cultures and the black one to LAC cultures. Ratios of (C) IL-17, (D) IFN- γ and (E) IL-10 levels measured in supernatants of PBMCs cultured with HF or LAC pleural fluids are represented. Basal cytokine levels in pleural fluids were subtracted. Results were expressed as ratios calculated by dividing HF or LAC values by FCS values. Error bars correspond to SEM. Statistical differences were analyzed by the Mann-Whitney test, $p < 0.05$ (*). HF, heart failure patients; iMFI, integrated mean fluorescence intensity; LAC, lung adenocarcinoma patients.

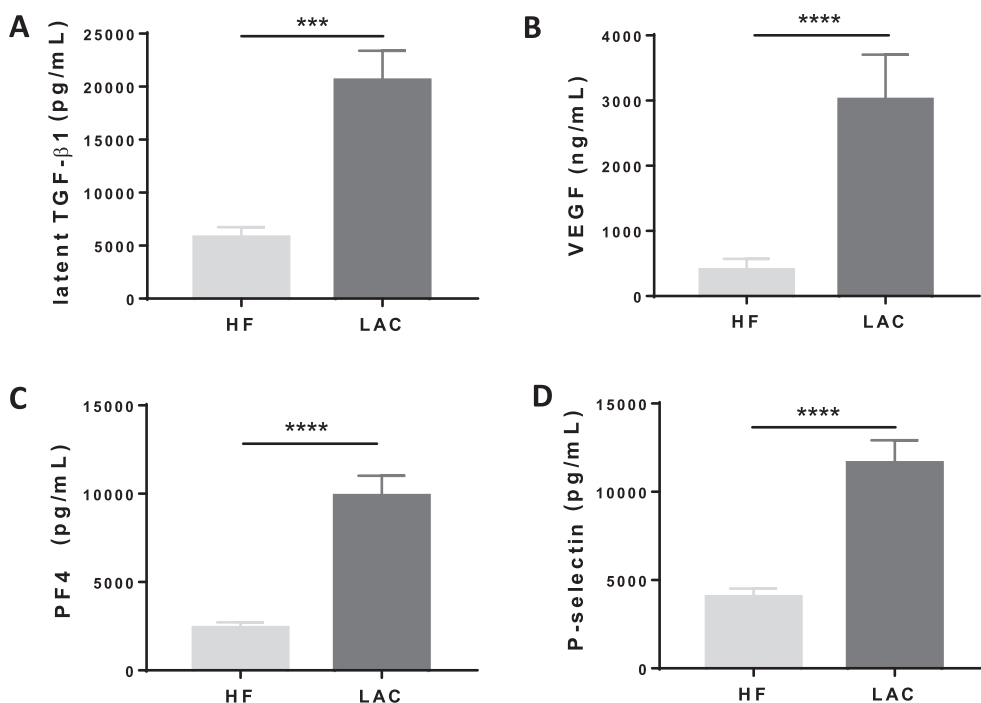


Fig. 3. Levels of soluble factors derived mainly by platelets in pleural fluids from HF and LAC patients. Levels of (A) latent TGF-β1 (pg/ml), (B) VEGF (ng/ml) and (C) PF4 (pg/ml) and (D) P-selectin (pg/ml) were determined by ELISA. Unpaired T-test and the Mann-Whitney test were used for statistical analysis: ***p < 0.001; ****p < 0.0001. HF; heart failure patients; LAC, lung adenocarcinoma patients.

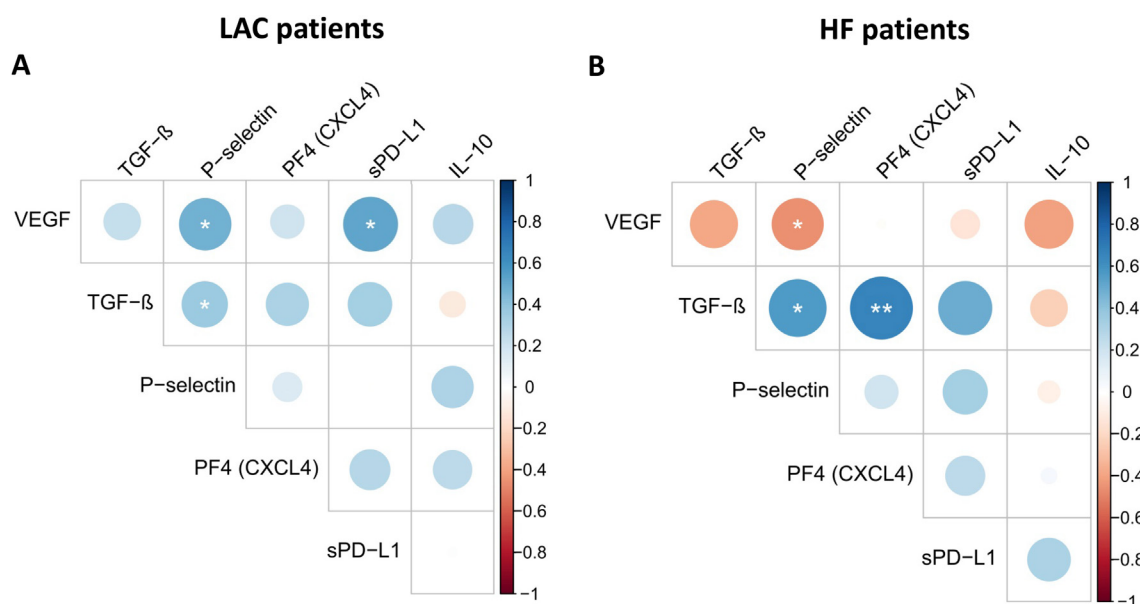


Fig. 4. Correlation matrixes between soluble factors with immunomodulatory properties present in pleural fluids from LAC and HF patients. Representation of the relationships between VEGF, TGF-β, P-selectin, PF4, sPD-L1, and IL-10 in pleural fluids from (A) LAC patients and (B) HF patients. Positive correlations are represented in shades of blue and negative correlations in shades of red. The statistical significance was represented by (*) p < 0.05, (**) p < 0.001 and (***) p < 0.0001. HF, heart failure patients; LAC, lung adenocarcinoma patients. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

LAC patients, we compared their levels in plasma and pleural fluids. The plasmatic levels of PF4 and P-selectin, which were higher than in pleural fluid, were comparable in HF and LAC patients (Supplementary Figs. 2A and C). However, we only found a positive correlation between the levels of P-selectin, but not PF4, in plasma and the respective pleural fluids (Supplementary Figs. 2B and 2D). To determine whether the lymphocytes or macrophages from pleural effusions were the origin of PF4, cells isolated from LAC and HF pleural fluids were cultured during 72 h and undetectable levels of PF4 were found (Fig. 1A and B in Data in Brief).

3.4. Effect of rhPF4 on T lymphocyte effector functions

To analyze the influence of PF4 on T lymphocyte functions, we cultured CFSE-stained PBMCs with anti-CD3 cocktail beads in the presence or absence of rhPF4 (2.5 μg/ml). The addition of rhPF4 decreased CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte proliferation (Fig. 6A). rhPF4 also reduced granzyme B expression in proliferative CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 6B). However, rhPF4 only tended to reduce granzyme B expression in non-proliferating T lymphocytes (data not shown). No differences in the expression of immune-checkpoints (BTLA, LAG-3, PD-1, PD-L1, TIGIT and TIM-3) were observed on T lymphocytes stimulated

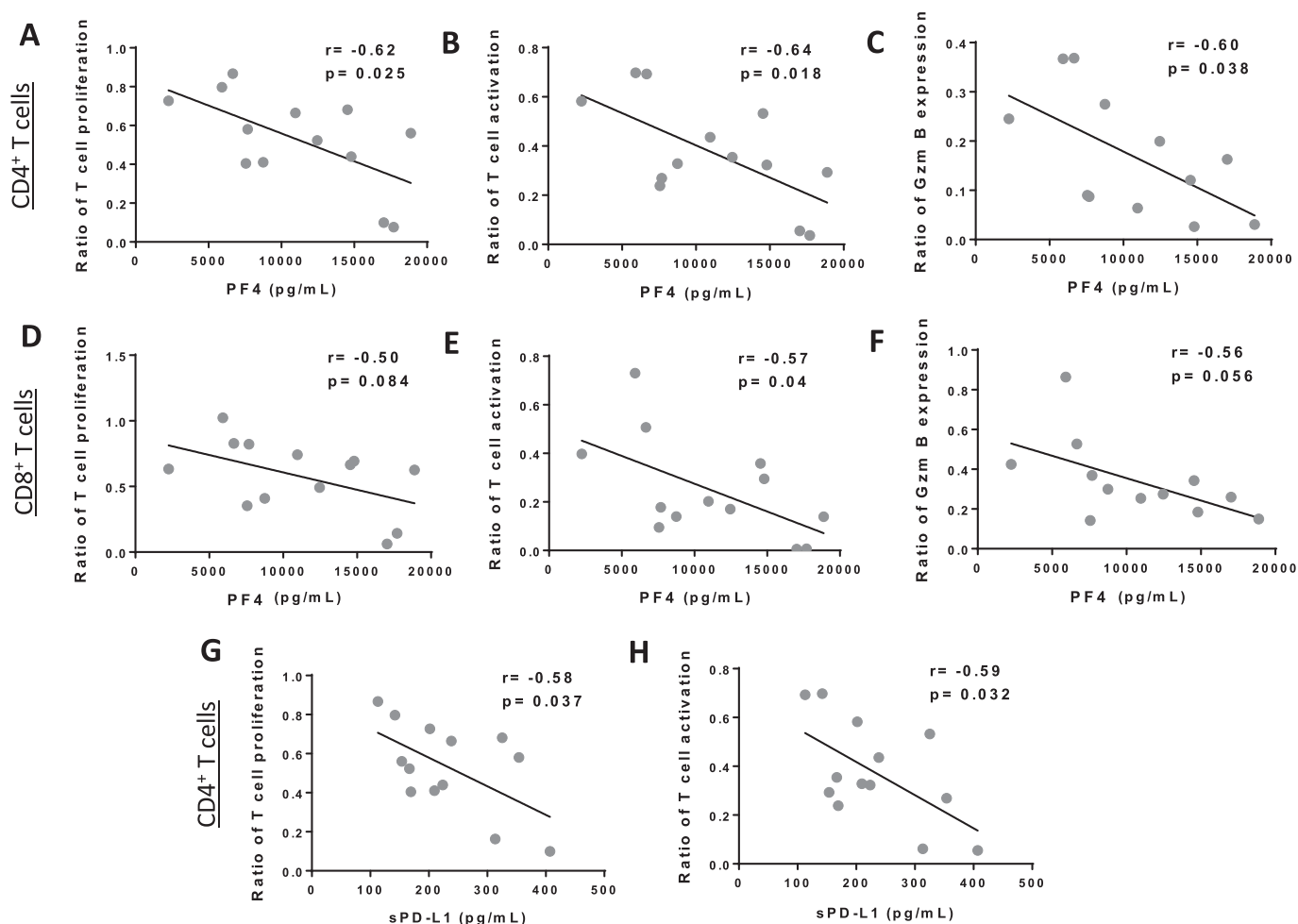


Fig. 5. Association between levels of PF4 and sPD-L1 in pleural fluids from LAC patients and T lymphocyte functions. Correlation between levels of PF4 (pg/ml) and ratio of (A, D) CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation, (B, E) CD4⁺ and CD8⁺ CD25⁺ T cell, and (C, F) granzyme B expression (iMFI). Negative correlations between levels of soluble PD-L1 (sPD-L1) and CD4⁺ T cell (G) proliferation and (H) activation are shown. Levels of PF4 and sPD-L1 were determined by ELISA. Pearson correlation coefficients with corresponding P-values are provided. Results were expressed as ratios calculated by dividing HF or LAC values by FCS values. HF, heart failure patients; iMFI, integrated mean fluorescence intensity; LAC, lung adenocarcinoma patients.

in the presence of rhPF4 (data not shown). IL-10 levels in the supernatants of T lymphocytes stimulated in the presence of rhPF4 were higher than in those without rhPF4 (Fig. 6C). IFN- γ and IL-17 levels tended to be higher in supernatants with added rhPF4. However, the increments of these cytokines in the supernatants were not correlated with the decrease of proliferation or granzyme B expression (data not shown).

3.5. Association of PF4 concentration in MPE and overall survival of patients

To analyze the clinical implications of high concentrations of PF4 in the pleural fluid, we classified the LAC patients as PF4 high or low according to their pleural fluid PF4 content at the time of MPE collection as described in materials and methods. Using the Kaplan-Meier method, we found that patients with lower levels of PF4 (PF4 low) had a better prognosis than those with higher levels (PF4 high) (Fig. 7A). The median overall survival of LAC patients with high and low levels of PF4 was 133 days and above 441 days respectively. Focusing on short-term mortality, the overall 60-day, 90-day and 180-day survival rates of the PF4 high group were 65%, 55% and 45% respectively. In contrast, the overall survival rates of those with low PF4 levels were 100% at 30 and 60 days, 93.3% at 90 days and 80% at 180 days. The Fisher T test revealed statistical differences in 60, 90 and 180 day-mortality between

both groups (Fig. 7B). The pleural concentration of other platelet-derived factors (TGF- β , VEGF and P-selectin) did not seem to influence the prognosis of LAC patients (Fig. 4 in Data in Brief).

4. Discussion

We have shown an impairment of the activation of T cells cultured in the presence of pleural fluids from LAC, but not from HF patients. This finding is consistent with the observation that T lymphocytes of MPE exhibit an increased expression of inhibitory molecules and a reduced cytotoxic activity [17]. One unexpected finding was the down-regulation of granzyme, but not of perforin, when cells were cultured with pleural fluids from LAC patients. One possible explanation is that expressions of perforin and granzyme B are not strictly co-regulated. Our findings also differ from those of Pace et al. that, using pleural fluids from different types of cancer patients, reported that CD8⁺ T cells isolated from malignant pleural fluids had reduced perforin content when compared to that from HF pleural fluids [21]. Another possible explanation is that the two studies included different types of cancer patients. Other findings that also suggest that MPE behaves as a tumor protecting microenvironment are the different pro- and anti-inflammatory mediators produced in the culture with LAC and HF pleural fluids. On one hand, we found that the levels of IL-17 were significantly lower in supernatants of LAC than in HF pleural fluid cultures. On the

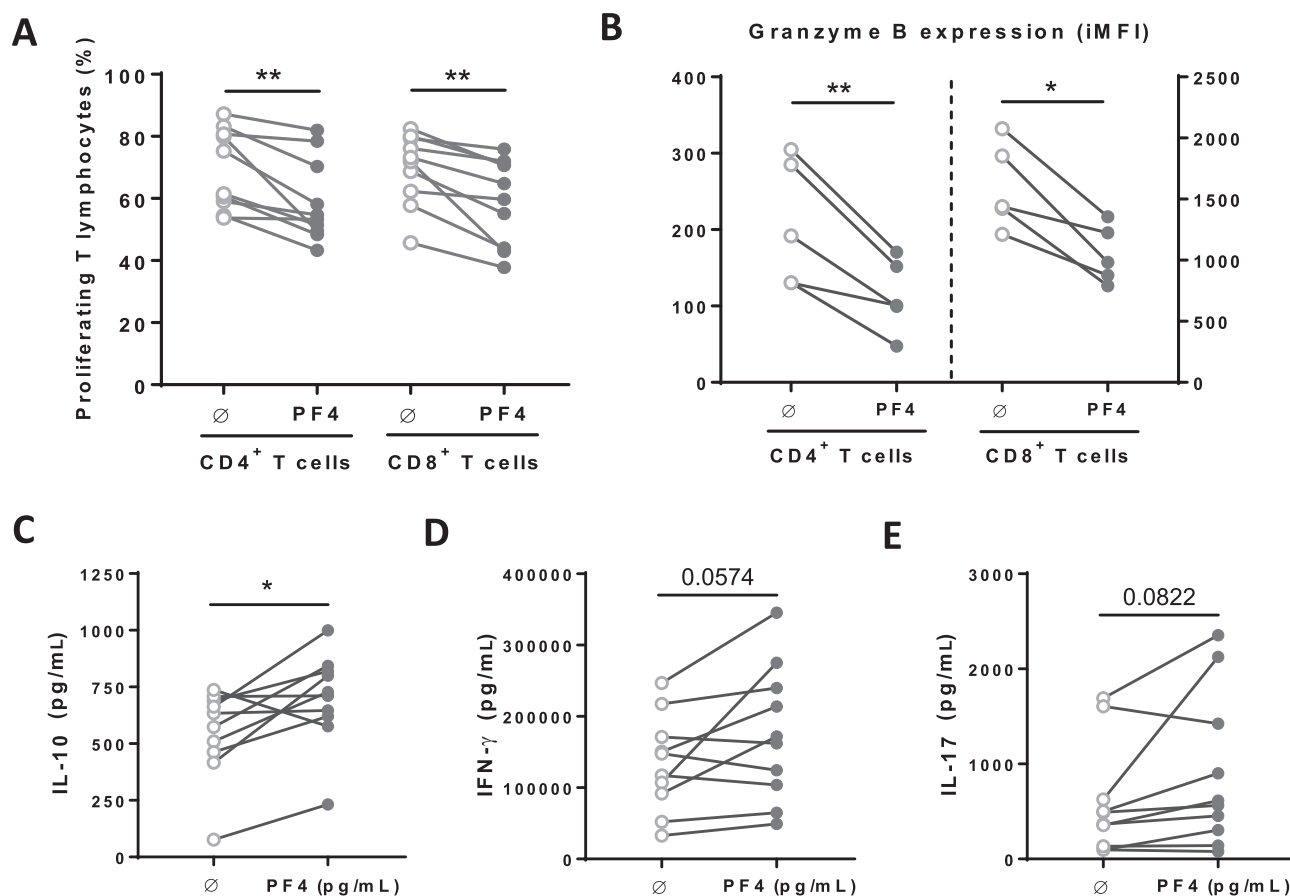


Fig. 6. Effect of recombinant human PF4 on T lymphocyte effector functions. CFSE-stained PBMCs (n = 10) were stimulated with anti-CD3 cocktail beads in the presence or absence of rhPF4. After culturing, cells were surface stained with anti-CD4-PE-Cy7 and anti-CD8-PerCP and intracellularly stained with anti-granzyme B-PE and analyzed by flow cytometry. (A) Comparison between the percentage of proliferating T lymphocytes with or without rhPF4. (B) Comparison between granzyme B expression on proliferating CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes cultured with or without rhPF4. Levels of (C) IL-10, (D) IFN- γ and (E) IL-17 of culture supernatants were analyzed by ELISA. The Wilcoxon test was used for statistical analysis. *p < 0.05; ** < 0.01.

other hand, IL-10 and IFN- γ levels tended to increase and decrease, respectively, in the supernatants of LAC cultures, resulting in a significant increased ratio favoring an anti-inflammatory response.

We found a significantly higher concentration of PF4, P-selectin, VEGF, and TGF- β in the pleural fluids of LAC than those of HF patients.

All these molecules have been shown to be released mainly by activated platelets and to contribute to tumor development and metastasis [11]. Some reports have already described that levels of VEGF and TGF- β are correlated and consistently higher in MPE than in HF pleural fluids. An intriguing question is the origin of these platelet-derived molecules in

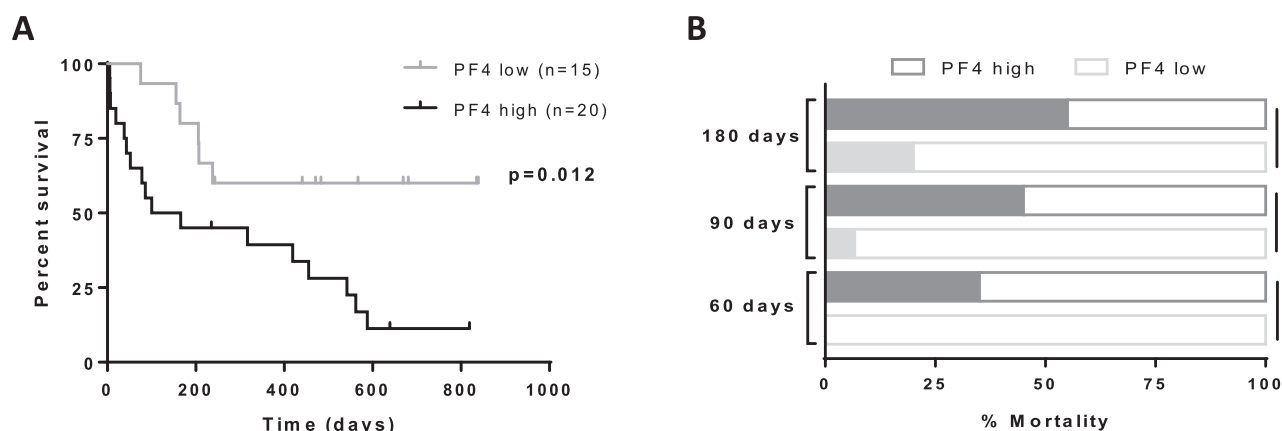


Fig. 7. Survival of LAC patients according to pleural effusion PF4 concentration measured at the time of MPE diagnosis. (A) Kaplan-Meier survival curve comparing LAC patients with high or low concentrations of PF4. Estimated survival rates were compared using the log-rank test. (B) Frequencies of short-time mortality of LAC patients with high or low pleural fluid PF4 concentrations are shown. Statistical differences regarding short-term mortality between PF4 high and PF4 low groups were analyzed by the Fisher test for each time. Pleural fluid PF4 levels cut-off value was determined by the mean PF4 concentration in HF pleural effusions + 3SD (6983.78 pg/mL). During follow-up, 12 patients were censored, consisting of 9 from the PF4 low group and 3 from the PF4 high group, while 20 patients died, 3 from the PF4 low group and 17 from the PF4 high group, respectively. LAC, lung adenocarcinoma patients; MPE, malignant pleural effusion.

pleural fluids. Although we did not detect significant numbers of platelets in pleural fluids, these factors may have entered through blood circulation and/or in the form of platelet-derived microparticles (PMPs). A passive diffusion of these molecules from the blood stream to the pleural space is unlikely since the plasma levels of PF4 and P-selectin were comparable between HF and LAC patients and, in both cases, they were higher in plasma than in pleural effusions. However, we cannot rule out that the high number of angiogenic factors in MPE increases the permeability of blood vessels [22]. Another possibility is that platelet-derived molecules entered from the circulation in the form of PMPs. In fact, we detected more PMPs in pleural effusions from LAC than in those from HF patients (data not shown). However, Roca et al. have already described found a comparable number of PMPs in malignant and benign effusions [23]. The discrepancy could be because Roca et al. included LAC and other malignancies. Moreover, platelet-derived molecules may not be produced exclusively by platelets. It has been reported that certain lymphocytes and tumor cells can also generate PF4 in low amounts [24]. However, we did not find cells in pleural fluids *in vitro* producing PF4, neither spontaneously nor after stimulation. With all these facts, it is tempting to speculate that once platelets reach the pleural fluid, they become activated and release PMPs and their contents.

We found that levels of PF4 negatively correlated with the proliferation and cytotoxic capacity of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. Previous studies reported that PF4 is able to inhibit T cell proliferation as well as IL-2 release *in vitro* [19,25]. Our findings, in addition, showed that rhPF4 significantly downregulated the expression of granzyme B in proliferating CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. The mechanism by which PF4 modulates T lymphocyte functions remains to be further elucidated. One possibility is that PF4 acts directly on T lymphocytes through CXCR3 [26,27] or alternative receptors, such as CCR1 and Mac-1 [28,29]. Another possibility is that PF4 induces the expression of immunomodulatory molecules on lymphocytes. However, we did not find changes in BTLA, LAG-3, PD-1, PD-L1, TIGIT, and TIM-3 expression when rhPF4 was added to the cultures. It is also possible that PF4 induces the production of regulatory cytokines. In this line, we found that PF4 tended to stimulate IL-10 secretion, biasing the T cell response towards an anti-inflammatory profile. Despite all these immunoregulatory effects of PF4, we cannot fully attribute the impairing effect on T cells to a single factor, as other factors in the complex tumoral microenvironment may exert an additive or synergic effect with PF4 in the modulation of T cell response. In this line, we have also observed that levels of sPD-L1 negatively correlate with CD4⁺ T cell activation.

Although the presence of MPE indicates a poor prognosis for advanced-stage non-small cell lung cancer (NSCLC) patients [30], there are few studies of the MPE-derived factors implicated in the overall survival. In the present study, we showed that high PF4 content in LAC pleural fluids was associated with poorer survival expectancy. This is consistent with previous reports showing that PF4 overexpression in primary LAC is associated with decreased survival rates [31]. In this line, Spaks et al. found that increased plasma PF4 levels in patients with NSCLC at stages IA-IIIB were associated with cancer-induced angiogenesis and a worse long-term outcome [32]. Our findings suggest that PF4 is a new biomarker to predict the outcome of LAC patients with MPE. It is possible that the combination of several markers will allow for overcoming patient heterogeneity, considering, among other factors, the cancer stage and treatment. A pending question that will be relevant for predicting the outcome is to determine the dynamics of PF4 concentration during the disease and the response to therapy.

Our findings suggest that platelet-derived factors, especially PF4, can negatively regulate T lymphocyte activation and cytotoxicity in pleural metastasis. A consequence is the significant advantage for the tumor to progress. The association of high PF4 pleural concentration with a worse outcome implies that PF4 may be a feasible non-invasive biomarker of the prognosis. Despite the importance of these results, we

are aware that the model has some limitations. One is that only advanced-stage LAC patients were included and there is a high level of heterogeneity in treatments, genetic background and clinical evolution. With our current approach, we cannot determine the implication of PF4 in the pleural metastasis of other malignancies such as breast or ovarian cancers. Another limitation is that our findings cannot be extrapolated to primary lung tumor since the phenotype and the functions of immune cells can differ from the metastatic microenvironment. We are currently working on solving these limitations using MPE as a model to investigate the evasion mechanisms of tumors in the disseminated stage of advanced LAC and other malignancies.

Declaration of competing interest

None.

Acknowledgements

This research was funded through a collaboration with Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Silvia Vidal was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) and she is a participant in the Program for Stabilization of Investigators of the Direcció d'Estrategia i Coordinació del Departament de Salut, Generalitat de Catalunya. This work has been performed within Ph.D. Immunology Program of Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.06.014>.

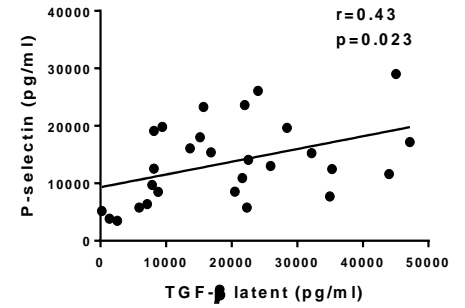
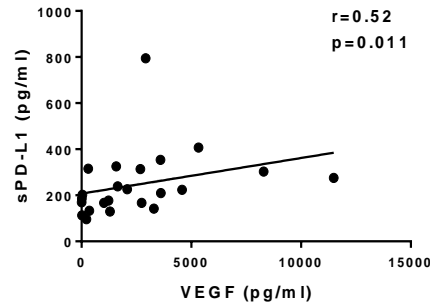
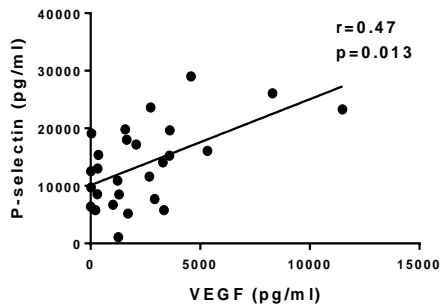
References

- [1] T. Agalioti, A.D. Giannou, G.T. Stathopoulos, Pleural involvement in lung cancer, *J. Thorac. Dis.* 7 (6) (2015) 1021–1030.
- [2] J.M. Thomas, A.I. Musani, Malignant pleural effusions. A review, *Clin. Chest Med.* 34 (3) (2013) 459–471.
- [3] C. Charalampidis, A. Youroukou, G. Lazaridis, S. Baka, I. Mpoukouvina, V. Karavasilis, et al., Pleura space anatomy, *J. Thorac. Dis.* 7 (Suppl 1) (2015) S27–S32.
- [4] V.S. Karkhanis, J.M. Joshi, Pleural effusion: diagnosis, treatment, and management, *Open Access Emerg. Med.* 4 (2012) 31–52.
- [5] I. Psallidas, I. Kalomenidis, J.M. Porcel, B.W. Robinson, G.T. Stathopoulos, Malignant pleural effusion: from bench to bedside, *Eur. Respir. Rev.* 25 (140) (2016) 189–198.
- [6] J.C. Nieto, C. Zamora, J.M. Porcel, M. Mulet, V. Pajares, A.M. Muñoz-Fernandez, et al., Migrated T lymphocytes into malignant pleural effusions: an indicator of good prognosis in lung adenocarcinoma patients, *Sci. Rep.* 9 (1) (2019) 2996.
- [7] J.F. Cailhier, D.A. Sawatzky, T. Kipari, K. Houlberg, D. Walbaum, S. Watson, et al., Resident pleural macrophages are key orchestrators of neutrophil recruitment in pleural inflammation, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173 (5) (2006) 540–547.
- [8] P. Filipazzi, V. Huber, L. Rivoltini, Phenotype, function and clinical implications of myeloid-derived suppressor cells in cancer patients, *Cancer Immunol. Immunother.* 61 (2) (2012) 255–263.
- [9] A. Facciabene, G.T. Motz, G. Coukos, T-Regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis, *Canc. Res.* 72 (9) (2012) 2162–2171.
- [10] L. Yang, Y. Zhang, Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application, *J. Hematol. Oncol.* 10 (1) (2017) 58.
- [11] M. Schlesinger, Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis, *J. Hematol. Oncol.* 11 (1) (2018) 125.
- [12] L. Martínez-Lostao, A. Anel, J. Pardo, How do cytotoxic lymphocytes kill cancer cells? *Clin. Canc. Res.* 21 (22) (2015) 5047–5056.
- [13] A. Takeuchi, T. Saito, CD4 CTL, a cytotoxic subset of CD4⁺ T cells, their differentiation and function, *Front. Immunol.* 8 (2017) 194.
- [14] C.Y. Hu, Y.H. Zhang, T. Wang, L. Chen, Z.H. Gong, Y.S. Wan, et al., Interleukin-2 reverses CD8⁺ T cell exhaustion in clinical malignant pleural effusion of lung cancer, *Clin. Exp. Immunol.* 186 (1) (2016) 106–114.
- [15] P. Murthy, C.N. Ekeke, K.L. Russell, S.C. Butler, Y. Wang, J.D. Luketich, et al., Making cold malignant pleural effusions hot: driving novel immunotherapies, *Oncolimmunology* 8 (4) (2019 Apr 3) e154969.
- [16] H. Prado-García, D. Aguilar-Cazares, H. Flores-Vergara, J.J. Mandoki, J.S. Lopez-Gonzalez, Effector, memory and naïve CD8⁺ T cells in peripheral blood and pleural effusion from lung adenocarcinoma patients, *Lung Canc.* 47 (3) (2005) 361–371.
- [17] L. Li, L. Yang, L. Wang, F. Wang, Z. Zhang, J. Li, et al., Impaired T cell function in malignant pleural effusion is caused by TGF- β derived predominantly from

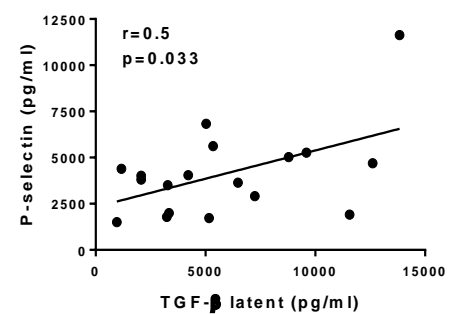
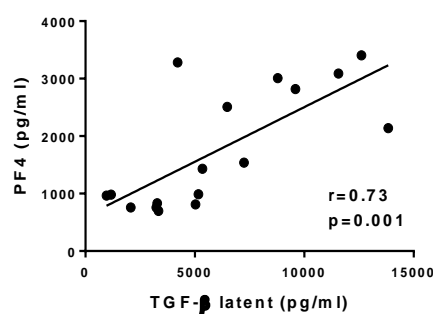
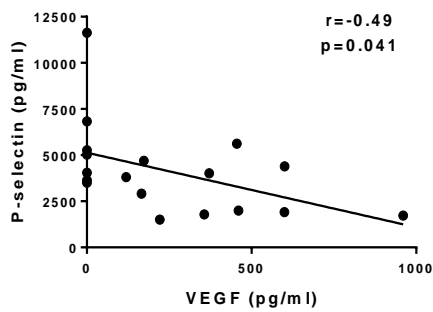
- macrophages, *Int. J. Canc.* 139 (10) (2016) 2261–2269.
- [18] C. Zamora, E. Cantó, J.C. Nieto, M.A. Ortiz, C. Diaz-Torné, C. Diaz-Lopez, et al., Functional consequences of platelet binding to T lymphocytes in inflammation, *J. Leukoc. Biol.* 198 (8) (2013) 3099–3108.
- [19] C.Y. Liu, M. Battaglia, S.H. Lee, Q.-H. Sun, R.H. Aster, G.P. Visentin, Platelet factor 4 differentially modulates CD4+CD25+ (regulatory) versus CD4+CD25- (non-regulatory) T cells, *J. Immunol.* 174 (5) (2005) 2680–2686.
- [20] T. Wei, Package “Corrplot” for R: Visualization of a Correlation Matrix, CRAN, 2017.
- [21] E. Pace, C. Di Sano, M. Ferraro, A. Tipa, D. Olivieri, M. Spatafora, et al., Altered CD94/NKG2A and perforin expression reduce the cytotoxic activity in malignant pleural effusions, *Eur. J. Canc.* 47 (2) (2011) 296–304.
- [22] B.K. Zebrowski, S. Yano, W. Liu, R.M. Shaheen, D.J. Hicklin, J.B. Putnam, et al., Vascular endothelial growth factor levels and induction of permeability in malignant pleural effusions, *Clin. Canc. Res.* 5 (11) (1999) 3364–3368.
- [23] E. Roca, R. Lacroix, C. Judicone, S. Laroumagne, S. Robert, S. Cointe, et al., Detection of EpCAM-positive microparticles in pleural fluid: a new approach to mini-invasively identify patients with malignant pleural effusions, *Oncotarget* 7 (3) (2016) 3357–3366.
- [24] S. Deng, Q. Deng, Y. Zhang, H. Ye, X. Yu, Y. Zhang, et al., Non-platelet-derived CXCL4 differentially regulates cytotoxic and regulatory T cells through CXCR3 to suppress the immune response to colon cancer, *Canc. Lett.* 443 (2019) 1–12.
- [25] J. Fleischer, E. Grage-Griebenow, B. Kasper, H. Heine, M. Ernst, E. Brandt, et al., Platelet factor 4 inhibits proliferation and cytokine release of activated human T cells, *J. Immunol.* 169 (2) (2002) 770–777.
- [26] A. Mueller, A. Meiser, E.M. McDonagh, J.M. Fox, S.J. Petit, G. Xanthou, et al., CXCL4-induced migration of activated T lymphocytes is mediated by the chemokine receptor CXCR3, *J. Leukoc. Biol.* 83 (4) (2008) 875–882.
- [27] A. Korniejewska, A.J. Mcknight, Z. Johnson, M.L. Watson, S.G. Ward, Expression and agonist responsiveness of CXCR3 variants in human T lymphocytes, *Immunology* 132 (4) (2011) 503–515.
- [28] J.M. Fox, F. Kausar, A. Day, M. Osborne, K. Hussain, A. Mueller, et al., CXCL4/Platelet Factor 4 is an agonist of CCR1 and drives human monocyte migration, *Sci. Rep.* 8 (2018) 9466.
- [29] V.K. Lishko, V.P. Yakubenko, T.P. Ugarova, N.P. Podolnikova, Leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18, M2, CR3) acts as a functional receptor for platelet factor 4, *J. Biol. Chem.* 293 (18) (2018) 6869–6882.
- [30] S. Sugiura, Y. Ando, H. Minami, M. Ando, S. Sakai, K. Shimokata, Prognostic value of pleural effusion in patients with non-small cell lung cancer, *Clin. Canc. Res.* 3 (1) (1997) 47–50.
- [31] F. Pucci, S. Rickelt, A.P. Newton, C. Garris, E. Nunes, C. Evavold, et al., PF4 promotes platelet production and lung cancer growth, *Cell Rep.* 17 (7) (2016 Nov 8) 1764–1772.
- [32] A. Spaks, D. Svirina, I. Spaka, I. Jaunalksne, D. Breiva, I. Tracums, et al., CXCL4 chemokine ligand 4 (CXCL4) is predictor of tumour angiogenic activity and prognostic biomarker in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients undergoing surgical treatment, *Biomarkers* 21 (5) (2016) 474–478.

Supplementary Figure 1

LAC

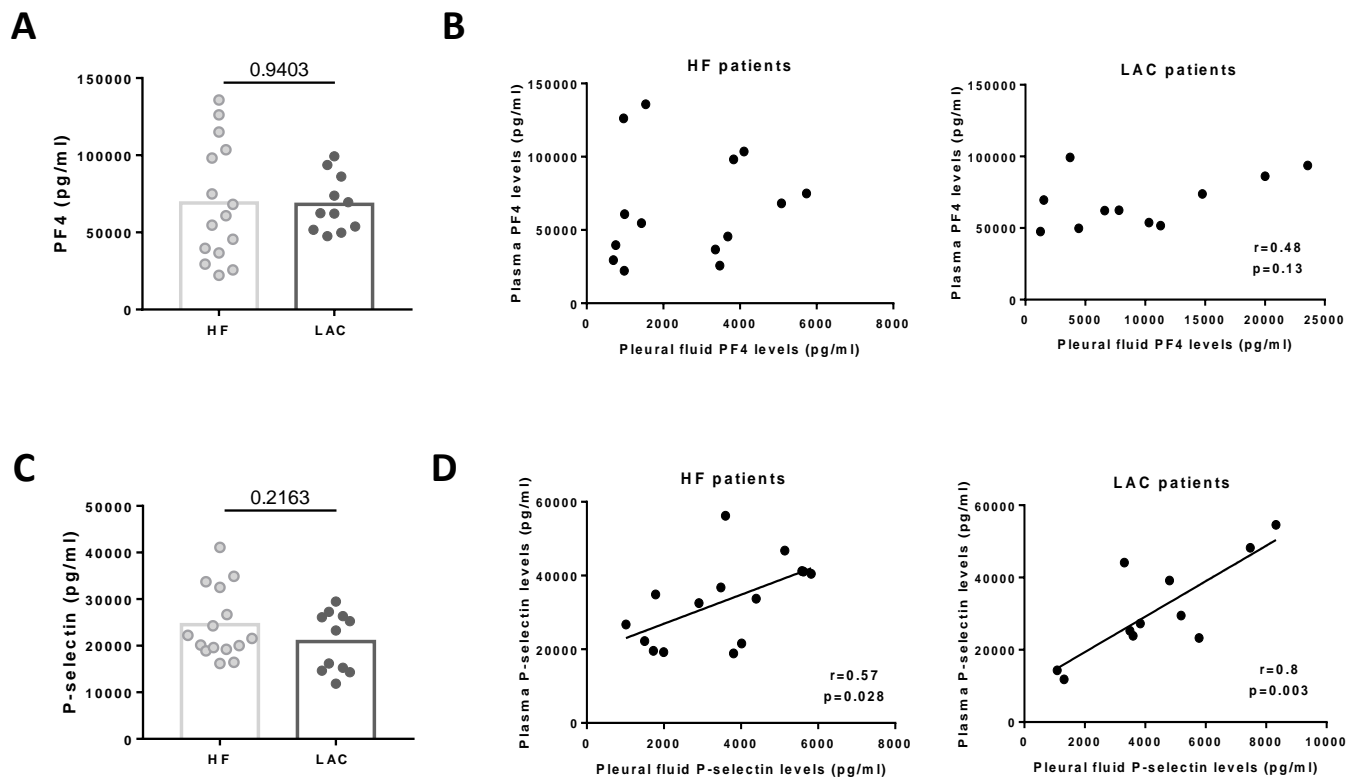


HF



Supplementary Figure 1. Demonstration of the associations between levels of platelet-derived factors in LAC and HF pleural fluids. Positive correlations between levels of VEGF (pg/ml) and levels of P-selectin (pg/ml) and sPD-L1 (pg/ml) were observed in LAC pleural fluids. Positive correlation between levels of P-selectin (pg/ml) and TGF- β (pg/ml) was observed in both LAC and HF pleural fluids. Negative correlation between levels of VEGF (pg/ml) and P-selectin (pg/ml) was observed in HF pleural fluids. Positive correlation between PF4 (pg/ml) and TGF- β (pg/ml) was observed HF pleural fluids. Levels of soluble factors were determined by ELISA. Correlation coefficients with corresponding P-values are provided.

Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2. Plasmatic levels of PF4 and P-selectin in HF and LAC patients and its association with their corresponding pleural fluid levels. (A) Comparison between levels of PF4 (pg/ml) in plasmas of HF patients with BPE and LAC patients with MPE. **(B)** Correlation between levels of PF4 in plasma and pleural fluid from HF and LAC patients. **(C)** Comparison between levels of P-selectin (pg/ml) in plasmas of HF patients with BPE and LAC patients with MPE. **(D)** Correlation between levels of P-selectin in plasma and pleural fluid from HF and LAC patients. Levels of soluble factors were determined by ELISA. Correlation coefficients with corresponding P-values are provided.

4.2. ARTICLE 1.2

Experimental supporting data on the influence of platelet-derived factors of malignant pleural effusions on T cell effector functions and their relevance in predicting prognosis of lung adenocarcinoma patients with pleural metastasis

Maria Mulet*, Carlos Zamora*, José M Porcel, Juan C Nieto, Virginia Pajares, Ana M Muñoz-Fernandez, Núria Calvo, Aureli Esquerda, Silvia Vidal

Data in Brief. 2020 Oct; 32:106266.



Data Article

Experimental supporting data on the influence of platelet-derived factors of malignant pleural effusions on T cell effector functions and their relevance in predicting prognosis of lung adenocarcinoma patients with pleural metastasis



Maria Mulet^{a,#}, Carlos Zamora^{a,#}, José M. Porcel^b, Juan C. Nieto^a, Virginia Pajares^c, Ana M. Muñoz-Fernandez^c, Nuria Calvo^d, Aureli Esquerda^e, Silvia Vidal^{a,*}

^a Department Immunology, Institut Recerca Hospital de La Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

^b Pleural Medicine Unit, Department of Internal Medicine, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, IRBLleida, University of Lleida, Lleida, Spain

^c Department Pneumology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

^d Department Oncology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

^e Department of Laboratory Medicine, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, IRBLleida, University of Lleida, Lleida, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 August 2020

Revised 24 August 2020

Accepted 28 August 2020

Available online 3 September 2020

Keywords:

Lung cancer

Malignant pleural effusion

Platelet-derived factors

Overall survival

ABSTRACT

The data described in this article are supplementary to our primary article "Platelet factor 4 regulates T cell effector functions in malignant pleural effusions". Malignant pleural effusion (MPE) is a common complication of advanced lung adenocarcinoma (LAC) associated with a poor life expectancy [1]. Several challenges need to be addressed to identify non-invasive molecular biomarkers that help to predict the prognosis of LAC patients with MPE [2]. In the primary publication, we proposed that platelet-derived factors, especially platelet factor 4 (PF4), can negatively regulate T lympho-

DOI of original article: [10.1016/j.canlet.2020.06.014](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.06.014)

* Corresponding author.

E-mail address: svidal@santpau.cat (S. Vidal).

These authors contribute equally.

<https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.106266>

2352-3409/© 2020 Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

cyte activation and granzyme B expression in pleural metastasis and its levels were associated with a worse prognosis. Here, we provide data on the influence of other platelet-derived factors, including transforming growth factor β (TGF- β), vascular endothelial factor (VEGF), and P-selectin on T lymphocyte response in MPE and their relevance as prognostic factors in lung cancer patients with pleural metastasis. Pleural fluids from 35 lung adenocarcinoma (LAC) and 20 heart failure (HF) patients were collected by thoracentesis and its platelet-derived factors' content was measured by specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISAs). Correlations between pleural levels of platelet-derived factors and T cell functions were analyzed by Pearson coefficients. Kaplan-Meier curves were used to estimate the effect of pleural concentrations of platelet-derived factors on overall survival of LAC patients with pleural metastasis. These analyses showed that the concentration of platelet-derived factors was not associated with T cell proliferation and cytotoxicity. Furthermore, their levels do not predict the survival of LAC with MPE.

© 2020 Published by Elsevier Inc.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Specifications Table

Subject	Cancer Research
Specific subject area	Malignant pleural effusion, lung cancer, platelet-derived factors
Type of data	Graphs and figures
How data were acquired	Concentrations of soluble factors of pleural fluids were determined by specific ELISA kits in LabSystems Multiskan microplate readers. The proliferation and cytotoxic capacity of T cells in the presence pleural fluids was evaluated by flow cytometry in a MACSQuant [®] Analyzer 10.
Data format	Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7 software.
Parameters for data collection	Analyzed Pleural fluids were collected from 35 advanced lung adenocarcinoma patients (stage IV) and from 20 heart failure patients as a control group. Molecular composition of pleural fluids and clinical parameters of patients were analyzed. Overall survival was measured from the date of MPE diagnosis to the date of the last-follow-up or death.
Description of data collection	Pleural fluid samples were collected by thoracentesis. Pleural concentrations of PF4, TGF- β , VEGF and P-selectin were determined by specific ELISAs. An <i>ex vivo</i> model with conditioned culture was proposed to study the effect of pleural fluid on T lymphocyte functions. Data of cultures was analyzed by flow cytometry.
Data source location	Pleural fluid samples from both lung adenocarcinoma and heart failure patients were collected from patients who attended to the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain) and the Hospital Universitari Arnau de Vilanova (Lleida, Spain).
Data accessibility	Blood samples were also obtained from healthy volunteers who attended to blood bank of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain). Data is provided in the article. Clinical characteristics of patients are provided in Table 1 of the related research article.
Related research article	Author's name: Maria Mulet, Carlos Zamora, José M. Porcel, Juan C. Nieto, Virginia Pajares, Ana M. Muñoz-Fernandez, Nuria Calvo, Aureli Esquerda, and Silvia Vidal. Title: Platelet factor 4 regulates T cell effector functions in malignant pleural effusions, Cancer Letters. Journal: Cancer Letters. Status: In press.

Value of the Data

- These data provide information about the PF4 production by pleural fluid cells and the association of baseline concentration of PF4 and other platelet-derived factors in pleural fluids with T cell function impairment and overall survival in lung adenocarcinoma patients with MPE.
- The data provided may be useful for researchers and clinicians that work in the field of pleural metastasis, who are interested in characterizing immune response of the tumor microenvironment and in understanding the relevance of molecular composition of malignant pleural effusions.
- Our findings can support further research exploring possible sources of platelet-derived factors and analyze whether these factors can be used as non-invasive prognostic biomarkers in pleural metastasis derived from other malignancies such breast or ovarian cancer.

1. Data Description

1.1. PF4 production by pleural fluid cells

We quantified PF4 production by pleural cells isolated from LAC or HF pleural fluids under spontaneous conditions and after T cell stimulation. In both cases, our *in vitro* experiments revealed that pleural cells isolated from LAC pleural fluids were able to release higher amounts of PF4 than those isolated from HF-related effusions (Fig. 1A-B). Regardless of the culture conditions, PF4 production by pleural cells did not reach the high concentrations of PF4 previously measured in pleural fluids (HF: 2411 ± 1490 pg/ml; LAC: 9884 ± 6708 pg/ml) [4]. The levels of PF4 in pleural fluids were not correlated with the number of CD4⁺ or CD8⁺ T cells in LAC pleural fluids (Fig. 1CD).

1.2. Association between T lymphocyte response impairment and platelet-derived factors in pleural fluids

We previously observed that PF4 pleural levels were negatively associated with T cell functions (proliferation and granzyme B expression) in MPE [4]. Here, we provide data about the association of other platelet-derived factors, also increased in MPE (TGF- β , P-selectin and VEGF), with the observed T cell impairment. None of soluble factors measured were correlated with neither CD4⁺ nor CD8⁺ T cell proliferation (Fig. 2) and cytotoxicity (measured by granzyme B expression) (Fig. 3).

1.3. The association between pleural levels of platelet-derived factors and the overall survival of LAC patients

In order to determine the implication of platelet-derived factors from pleural fluids on predicting the prognosis of LAC patients with MPE, we distributed patients in two groups according to their pleural concentrations. The cut-off values for each platelet factor were calculated by the mean levels of HF pleural fluids + 2 SD. With these cutoff values, we distributed LAC patients in two groups, high and low levels.

Using Kaplan-Meier curves, we found that pleural levels of TGF- β , P-selectin and VEGF did not seem to influence the overall survival rates as there were no statistical differences between patients with high or low levels (Fig. 4).

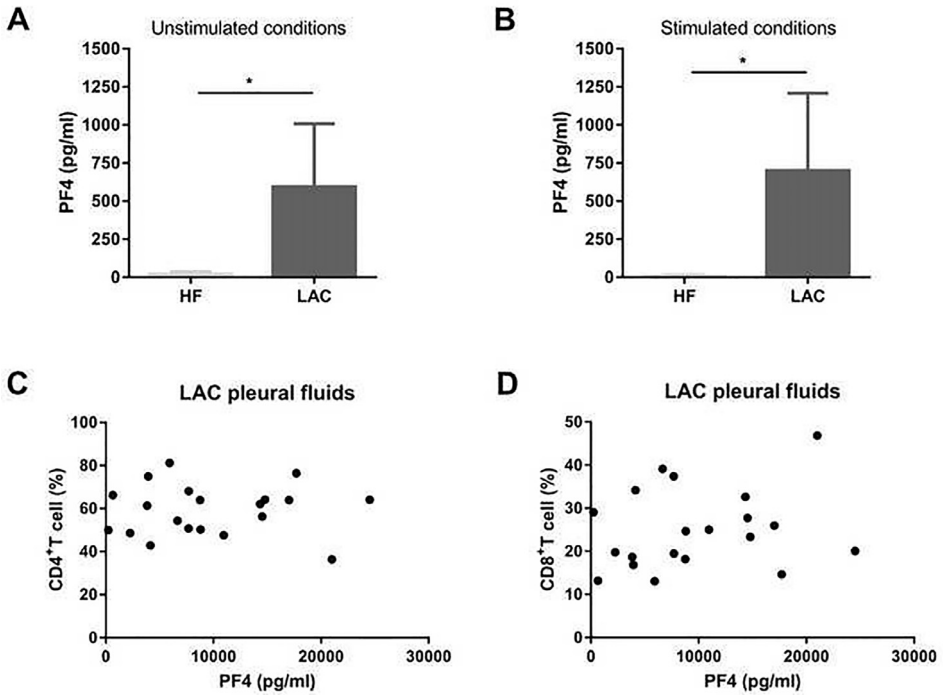


Fig. 1. Origin of platelet factor 4 in pleural fluids and its association with T lymphocyte composition. Comparison between PF4 production by pleural fluid cells from HF (n=4) and LAC (n=5) pleural fluids under (A) spontaneous conditions or (B) after T cell stimulation. Association between PF4 pleural levels and the frequencies of (C) CD4⁺ and (D) CD8⁺ T lymphocytes. Levels of PF4 in pleural fluids and *in vitro* cultures were determined by ELISA. Mann-Whitney test and Spearman coefficient were used for statistical analyses. *p < 0.05. HF, heart failure patients; LAC, lung adenocarcinoma patients.

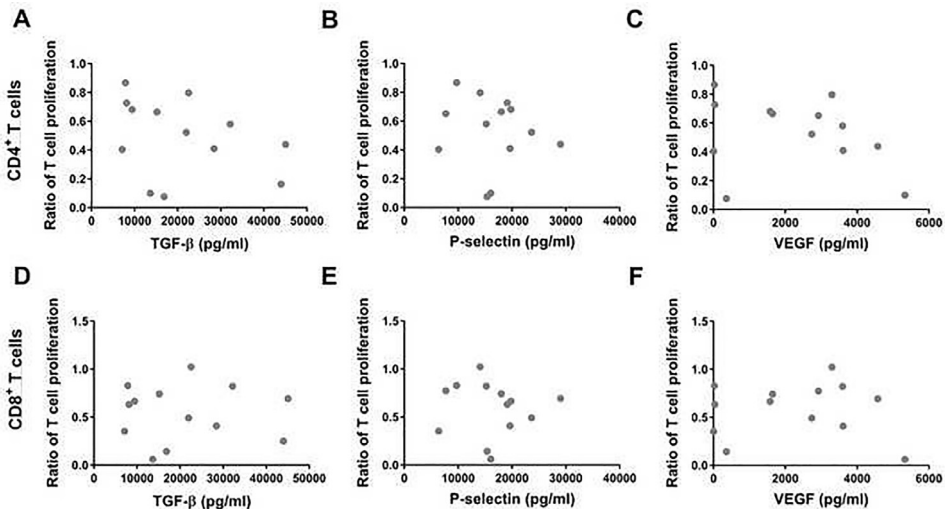


Fig. 2. Association between levels of platelet-derived factors in pleural fluids and T lymphocyte proliferation. Correlation of (A) TGF-β, (B) P-selectin and (C) VEGF with CD4⁺ T cell proliferation. Correlation of (D) TGF-β, (E) P-selectin and (F) VEGF with CD8⁺ T cell proliferation. Statistical analysis was performed using Pearson coefficient.

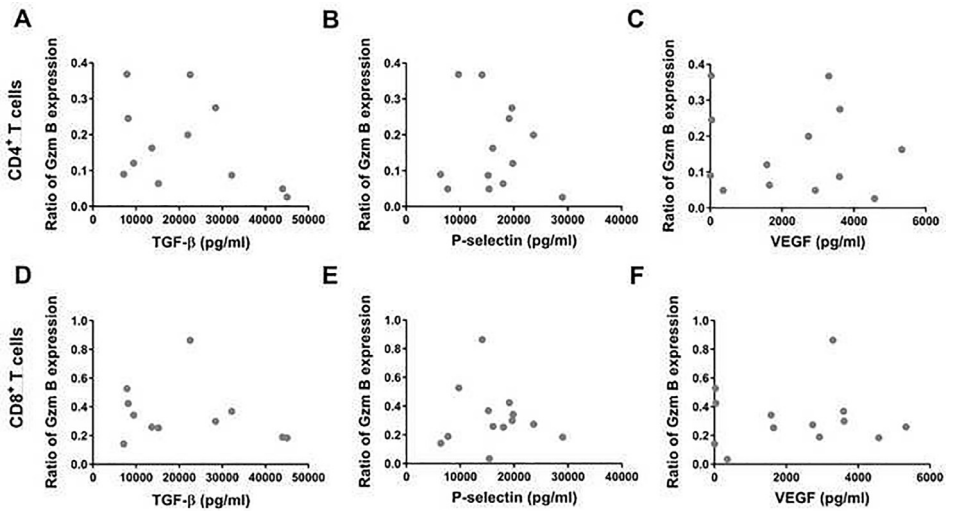


Fig. 3. Association between levels of platelet-derived factors in pleural fluids and T lymphocyte granzyme B expression. Correlation of (A) TGF- β , (B) P-selectin and (C) VEGF with CD4⁺ T cell granzyme B expression. Correlation of (D) TGF- β , (E) P-selectin and (F) VEGF with CD8⁺ T cell granzyme B expression. Statistical analysis was performed using Pearson coefficient.

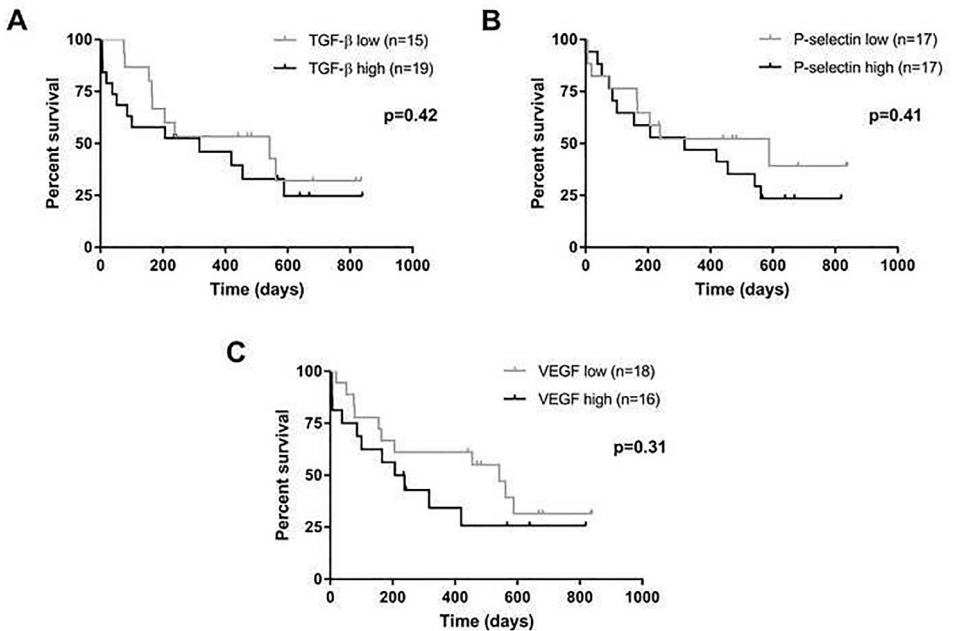


Fig. 4. Survival of LAC patients according to pleural levels of platelet-derived factors measured at the time of MPE diagnosis. Kaplan-Meier survival curves comparing LAC patients with high or low concentrations of (A) TGF- β , (B) P-selectin and (C) VEGF. Estimated survival rates were compared using the log-rank test. Pvalues are provided in the graphs.

2. Experimental Design, Materials and Methods

2.1. Pleural fluid samples

Pleural fluid samples were collected from 35 LAC and 20 HF patients from the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona) and Hospital Universitari Arnau de Vilanova (Lleida). Heparin (10 U/ml; Hospira, Lake Forest, IL, USA) was added to fresh pleural fluids before filtering them with a 40 μm sterile filter. After spinning down the cellular pellet, leukocyte composition (T cells, macrophages, and neutrophils) was determined by flow cytometry as it is explained in detail in the primary article [4]. Cell-free pleural fluids were stored at -80°C to further determine concentrations of platelet-derived factors. Clinical and molecular profiles of patients are presented in the related research article (Table 1 and Fig. 3, respectively) [4].

2.2. Quantification of platelet-derived factors in pleural fluids

Pleural concentrations of TGF- β (Mabtech, Sweden), VEGF (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), P-selectin (R&D Systems, MN, USA) and PF4 (Peprotech) were measured by specific ELISAs.

2.3. In vitro culture of pleural fluids cells

Cells from pleural fluids were collected by centrifugation (574 \times g, 5 min) and cultured in complete medium (RPMI 1640 (HyClone, Logan, Utah, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel), 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (BioWhittaker, Verviers, Belgium)) for 72 h at 37°C in 5% CO_2 . On the other hand, pleural fluid cells were also stimulated with T cell activation/expansion kit (cocktail of anti-CD3, -CD28 and anti-CD2) according to manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Supernatants of cultures were kept at -20°C to further determine PF4 production by ELISA.

2.4. In vitro culture of PBMCs in the presence of pleural fluids

Peripheral mononuclear cells (PBMCs) were isolated from healthy volunteers' blood by Ficoll-density gradient (Lymphoprep, AXIS-SHIELD PoCAs, Oslo, Norway) as previously described [3] and adjusted to 10^7 cell/ml in RPMI medium. Then, cells were stained with 10 μM of carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; Sigma, St. Louis, Missouri) to further determine T cell proliferation. After washing, cells were adjusted to $5 \cdot 10^6$ cell/ml in RPMI medium and cultured in 96-well plates in the presence of 50% of pleural fluids from LAC or HF patients for 72 h at 37°C in 5% CO_2 . Some cells were also cultured in the presence of 50% FCS in order to have a control of activation and normalize results. T cell stimulation was performed with T cell activation/expansion kit which contains a cocktail of anti-CD3, anti-CD2 and anti-CD28 antibodies according to manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec).

2.5. Cellular staining and flow cytometry analysis

After 72 h of culture in the presence of pleural fluids, PBMCs were harvested and surface stained with anti-CD4-PECy7 (BioLegend, San Diego, CA, USA) and antiCD8-PerCP (BD Bioscience, San Jose, USA) and intracellular stained with anti-granzyme B-PE (eBioscience, San Diego, CA, USA).

For data analysis, doublets were excluded and cells were gated according to their morphology by forward- versus side-scatter (FSC-SSC) dotplot. The cellular viability was assessed by flow cytometry using the LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (Thermo Fisher Scientific, Oregon, USA). Proliferation cycles of T cells were analyzed in the B1 channel (FITC). Percentages of positive cells and mean fluorescence intensity (MFI) were calculated using the MACSQuantify™ software (Miltenyi Biotec).

2.6. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Comparison between PF4 production by LAC and HF pleural cells was determined by the Mann-Whitney test. Correlations between the pleural concentration of platelet-derived factors and T lymphocyte functions were analyzed by Pearson test (for PF4, P-selectin and TGF- β) and Spearman test (for VEGF) according to their respective data distribution. Survival analyses were assessed by Kaplan–Meier curves and Log-rank statistics. Differences were significant at $p \leq 0.05$.

Ethics Statement

Written informed consent was obtained from all patients and healthy volunteers. Samples were anonymized and ethical approval of the study was granted by the Institutional Ethics Committee of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This research was funded through a collaboration with Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Silvia Vidal was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) and she is a participant in the Program for Stabilization of Investigators of the Direcció d'Estrategia i Coordinació del Departament de Salut, Generalitat de Catalunya. This work has been performed within Ph.D. Immunology Program of Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

References

- [1] I. Psallidas, I. Kalomenidis, J.M. Porcel, B.W. Robinson, G.T. Stathopoulos, Malignant pleural effusion: From bench to bedside, *Eur. Respir. Rev* 25 (2016) 189–198 <https://doi.org/10.1183/16000617.0019-2016>.
- [2] A.O. Clive, B.C. Kahan, C.E. Hooper, R. Bhatnagar, A.J. Morley, N. ZahanEvans, O.J. Bintcliffe, R.C. Boshuizen, E.T.H. Fysh, C.L. Tobin, A.R.L. Medford, J.E. Harvey, M.M. Van Den Heuvel, Y.C.G. Lee, N.A. Maskell, Predicting survival in malignant pleural effusion: Development and validation of the LENT prognostic score, *Thorax* 69 (2014) 1098–1104 <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-205285>.
- [3] C. Zamora, E. Cantó, J.C. Nieto, M.A. Ortiz, C. Diaz-Torné, C. Diaz-Lopez, J.M. Llobet, C. Juarez, S. Vidal, Functional consequences of platelet binding to T lymphocytes in inflammation, *J. Leukoc. Biol.* 198 (2013) 3099–3108 <https://doi.org/10.1189/jlb.0213074>.
- [4] M. Mulet, C. Zamora, J.M. Porcel, J.C. Nieto, V. Pajares, A.M. MuñozFernandez, N. Calvo, A. Esquerda, S. Vidal, Platelet factor 4 regulates T cell effector functions in malignant pleural effusions, *Cancer Lett* (2020) In press.

4.3. ARTICLE 2




Influence of Malignant Pleural Fluid from Lung Adenocarcinoma Patients on Neutrophil Response

Maria Mulet, Rubén Osuna-Gómez, Carlos Zamora, José M. Porcel, Juan C. Nieto, Lía Perea, Virginia Pajares, Ana M. Muñoz-Fernandez, Nuria Calvo, Maria Alba Sorolla, Silvia Vidal

Cancers. 2022 May; 14(10):2529.

Article

Influence of Malignant Pleural Fluid from Lung Adenocarcinoma Patients on Neutrophil Response

Maria Mulet ¹, Rubén Osuna-Gómez ¹, Carlos Zamora ¹, José M. Porcel ² , Juan C. Nieto ¹ , Lúdia Perea ¹, Virginia Pajares ³, Ana M. Muñoz-Fernandez ³, Nuria Calvo ⁴, Maria Alba Sorolla ⁵ , and Silvia Vidal ^{1,*}

¹ Inflammatory Diseases, Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Biomedical Research Institute Sant Pau (IIB Sant Pau), 08041 Barcelona, Spain; mmulet@santpau.cat (M.M.); rosuna@santpau.cat (R.O.-G.); carlosza86@gmail.com (C.Z.); juan.nieto@cnag.crg.eu (J.C.N.); perasoriano.lidia@gmail.com (L.P.)

² Pleural Medicine Unit, Department of Internal Medicine, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, IRBLleida, University of Lleida, 25003 Lleida, Spain; jmporcel.lleida.ics@gencat.cat

³ Department of Pneumology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; vpajares@santpau.cat (V.P.); amunozf.girona.ics@gencat.cat (A.M.M.-F.)

⁴ Department of Oncology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; ncalvo@santpau.cat

⁵ Research Group of Cancer Biomarkers, IRBLleida, 25198 Lleida, Spain; msorolla@irbllleida.cat

* Correspondence: svidal@santpau.cat



Citation: Mulet, M.; Osuna-Gómez, R.; Zamora, C.; Porcel, J.M.; Nieto, J.C.; Perea, L.; Pajares, V.; Muñoz-Fernandez, A.M.; Calvo, N.; Sorolla, M.A.; et al. Influence of Malignant Pleural Fluid from Lung Adenocarcinoma Patients on Neutrophil Response. *Cancers* **2022**, *14*, 2529. <https://doi.org/10.3390/cancers14102529>

Academic Editors: Rajesh Singh and Santosh Kumar Singh

Received: 20 April 2022

Accepted: 18 May 2022

Published: 20 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: This study provides novel information about the role of neutrophils in malignant pleural effusion (MPE) and hallmarks their clinical relevance. Since these cells have emerged as important regulators of cancer, we characterized their phenotype and functions in MPE microenvironment. We found that neutrophil-derived products (degranulation molecules and neutrophil extracellular traps (NETs)) were increased in MPE. In addition, NETs were associated with a worse outcome in lung adenocarcinoma patients with MPE.

Abstract: Malignant pleural effusion (MPE) is a common severe complication of advanced lung adenocarcinoma (LAC). Neutrophils, an essential component of tumor infiltrates, contribute to tumor progression and their counts in MPE have been associated with worse outcome in LAC. This study aimed to evaluate phenotypical and functional changes of neutrophils induced by MPE to determine the influence of MPE immunomodulatory factors in neutrophil response and to find a possible association between neutrophil functions and clinical outcomes. Pleural fluid samples were collected from 47 LAC and 25 heart failure (HF) patients. We measured neutrophil degranulation products by ELISA, oxidative burst capacity and apoptosis by flow cytometry, and NETosis by fluorescence. The concentration of degranulation products was higher in MPE-LAC than in PE-HF. Functionally, neutrophils cultured with MPE-LAC had enhanced survival and neutrophil extracellular trap (NET) formation but had reduced oxidative burst capacity. In MPE, NETosis was positively associated with MMP-9, P-selectin, and sPD-L1 and clinically related to a worse outcome. This is the first study associating NETs with a worse outcome in MPE. Neutrophils likely contribute to tumor progression through the release of NETs, suggesting that they are a potential therapeutic target in LAC.

Keywords: malignant pleural fluid; lung adenocarcinoma; neutrophils; NETosis

1. Introduction

Malignant pleural effusion (MPE), a common complication of advanced cancer, is defined by the presence of tumor cells in pleural fluid and is associated with poor prognosis [1]. Metastatic lung cancer has been identified as the cause of over one-third of all MPEs. Non-malignant conditions, such as congestive heart failure (HF), can also lead to the build-up of fluid in the pleural space due to increased hydrostatic pressure [2]. However, some limitations hamper both an accurate diagnosis and the discrimination between MPEs

and benign pleural effusions (BPEs) [3]. Considering that multiple factors contribute to the complexity in MPE diagnosis, the identification of definitive biomarker requires to unravel the molecular and cellular composition of these pleural fluids.

The cellular composition of pleural effusions depends on the etiology of the disease and may be related with the outcome. In particular, a high neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) in MPE has been associated with shorter overall survival in lung cancer patients [4]. In line with these findings, we have recently found a negative association between the presence of neutrophils in the pleural fluid and the survival of lung adenocarcinoma (LAC) patients with MPE [5]. Although our previous study showed no differences in the number of neutrophils between MPEs and BPEs, we also reported an increased neutrophil count in those MPEs with more tumor cells, suggesting a possible link between those two cell types [5]. It is possible that circulating granulocytes rapidly migrate to the site of inflammation (i.e., the pleural space) under the influence of several chemoattractants such as interleukin-8 (IL-8) [6,7], leukotriene B4 [8], and epithelial neutrophil-activating peptide-78 [9].

In addition to their traditionally antimicrobial function, the role of neutrophils in the tumor microenvironment (TME) as immunosuppressor cells has been increasingly appreciated [10]. Recently, Singel et al. observed a neutrophil suppressor phenotype when co-culturing them with stimulated T cells in the presence of MPEs [11]. The polarization of neutrophils toward a protumor or antitumor phenotype depends on inflammatory mediators secreted by the tumor and immune cells of the TME [12]. As protumor cells, neutrophils promote LAC growth via the secretion of neutrophil elastase (NE) [13] and metastasis through the release of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), which degrades the basement membrane [14]. Another mechanism related to tumor progression is the formation of neutrophil extracellular traps (NETs). Diverse stimuli are thought to be involved in the induction of NETs, including microorganisms, activated platelets [15], and proinflammatory cytokines [16]. NETs lead to a cell death known as NETosis. During NETosis, there is a release of decondensed deoxyribonucleic acid (DNA), accompanied by citrullinated histones and granule proteins [17]. Neutrophils can produce NETs, which would protect tumor cells from cytotoxic T lymphocytes [18] and awaken dormant cancer cells [19]. As antitumor cells, neutrophils mediate tumor cell death through the production of reactive oxygen species (ROS) [20] and nitric oxide (NO) [21].

Based on our previous results, we have considered two possible nonexclusive mechanisms to explain the role of neutrophils in MPE. First, we propose that phenotypic changes on neutrophils, probably due to the presence of a tumor, regulate cell function, and promote tumor progression. Second, soluble molecules in MPE can modulate neutrophil response against cancer, including viability, degranulation, NETosis, and oxidation burst. Considering the importance of platelet–neutrophil crosstalk in cancer, we also analyze the association between platelet-derived factors and neutrophil responses. Finally, we determined the clinical relevance of neutrophil activity as a diagnostic or/and prognostic biomarker for LAC patients with MPE.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Pleural Fluid Samples

We prospectively enrolled patients with MPE secondary to LAC (stage III/IV) ($n = 47$) and patients with BPE due to congestive HF ($n = 25$) who were admitted to Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona) and Hospital Arnau de Vilanova (Lleida) (Table 1). Malignancy of pleural fluids secondary to LAC was based on the cytological detection of tumor cells. Congestive HF is a chronic progressive condition that alters the pumping capacity of the heart muscle. PEs from HF patients were used as a negative control of malignancy. Pleural fluid samples were collected at the time of MPE diagnosis, in the case of LAC patients, by thoracentesis and 10 U/mL heparin (Hospira, Lake Forest, IL, USA) was added. Pleural fluid samples were filtered before spinning them down to cell pellets. Cell composition was subsequently analyzed by flow cytometry and cell-free

pleural effusions (cf-PEs) were filtered again (0.22 µm) and stored at −80 °C until use. The study was approved by the Institutional Ethics Committee of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Table 1. Demographic, clinical, and molecular parameters of the patients with pleural effusions included in the study.

Patients Characteristics	HF	LAC	p Value
Number of patients	25	47	
Male/female	17/8	36/11	n.s.
Median age (range), years	85 (81–88)	69 (62–75)	<0.001
Median (IQR) survival time from diagnosis, days	NA	203.5 (69.3–527.8)	
EGFR mutations	NA	11/47	
ALK mutations	NA	4/47	
ECOG PS			
0	NA	12/47	
1	NA	8/47	
2	NA	5/47	
3	NA	10/47	
4	NA	5/47	
NA	NA	7/47	
Biochemical parameters			
Glucose (mg/mL)	125.5 (102.8–154)	99 (81.56–123.8)	0.026
Lactate dehydrogenase (U/L)	163.5 (138.8–211.3)	755 (449–1253)	<0.001
C-reactive protein (mg/L)	3.8 (2.3–10.9)	11.2 (6.4–34.6)	0.004
Adenosine deaminase (U/L)	4.3 (3.2–7.8)	7.4 (5.1–10.5)	n.s.
Total protein (g/dL)	2.6 (1.8–3)	4.8 (4–5.7)	<0.001
pH	7.5 ± 0.02	7.4 ± 0.02	0.001
Treatment			
Radiotherapy	NA	5/47	
Chemotherapy	NA	17/47	
Immunotherapy	NA	10/47	
ALK inhibitors	NA	2/47	
EGFR inhibitors	NA	5/47	
Her2 inhibitors	NA	2/47	
Untreated or palliative care	NA	6/47	
Soluble platelet-related molecules in pleural fluids			
PF4 (pg/mL)	3281 (2125–4593)	8282 (4107–14,605)	<0.001
VEGF (ng/mL)	119.3 (1–455.3)	2377 (313.3–3598)	0.001
P-selectin (pg/mL)	4440 ± 323.7	11,484 ± 1260	0.001
TGF-β (pg/mL)	11,572 (9320–15,950)	16,838 (8662–28,772)	0.04
CD40L (pg/mL)	2.1 (1–56.2)	26.2 (2.1–157.1)	0.07
PD-L1 (pg/mL)	40.3 (32.5–73.6)	96.4 (76.4–132.6)	<0.001

ALK: anaplastic lymphoma kinase; EGFR: epidermal growth factor receptor; HF, heart failure; LAC, lung adenocarcinoma; NA, not applicable; n.s., non-significant; PF4, platelet factor 4, CD40L, soluble CD40L; PD-L1, soluble programmed death-ligand 1; TGF-β, transforming growth factor-β; VEGF, vascular endothelial growth factor. Nonparametric Mann–Whitney test was used for all comparisons except for pH and P-selectin, which were compared by *t*-test.

2.2. Phenotyping Neutrophils from Pleural Effusions by Flow Cytometry

Cells from pleural fluids were collected by centrifugation and red blood cells were lysed. Then, one million cells were stained with different mAb panels to identify the neutrophil population and to determine the surface expression of inhibitory receptors in a MACSQuant cytometer. Antibody panels included anti-CD45-VioBlue (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany, clone 8C11), anti-CD14-APC (Immunotools, Friesoythe,

Germany, clone OKT-4), anti-CD16-FITC (Immunotools, clone 3G8) and inhibitory receptors markers. In Panel A, cells were stained with anti-CD200R-PerCP (eBioscience, San Diego, CA, USA, clone OX108). In Panel B, cells were stained with anti-CD85a-PerCP-Vio770 (Miltenyi Biotec, clone REA207). Panel C included anti-CD14-APC, -CD15-PE-Cy7 (BD Bioscience, San Jose, CA, USA, clone HI98), -S100A8/9-FITC (OriGene Technologies Inc, Rockville, MD, clone BM4025F) and -HLA-DR-APC-H7 (BD Biosciences, clone G46-6). Finally, cells were washed with PBS 1% bovine serum albumin (BSA), resuspended in PBS, and acquired by flow cytometry. Neutrophils were identified as CD14⁺ CD16⁺ or CD14⁺ CD15⁺ cells after being gated on CD45/side-scatter (SSC) plot. The percentage of positive cells and the integrated mean fluorescence intensity (iMFI) of inhibitory receptors were calculated using FlowJo software version 10.6.1 (Ashland, OR, USA). The identification and quantification of tumor cells in MPEs from LAC patients was assessed by flow cytometry [5].

2.3. Isolation of Neutrophils from Healthy Donors

Venous blood from 10 healthy donors was taken from the blood bank of Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and collected in heparin-coated Vacutainer tubes (BD Bioscience). Neutrophils were isolated by Ficoll-Hypaque (Lymphoprep Axis-shield PoCAs, Oslo, Norway) density-gradient centrifugation followed by dextran-sucrose (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) sedimentation for 30 min. Finally, red blood cells were lysed (RBC Lysis Buffer, BioLegend, San Diego, CA, USA) and purity >95% was assessed by flow cytometry.

2.4. Induction and Quantification of NETosis in the Presence of Cell-Free Pleural Fluids

Briefly, freshly isolated healthy neutrophils were resuspended at 6×10^6 cell/mL in complete RPMI medium supplemented with 25% of cf-MPE-LAC or cf-PE-HF. We also cultured cells with completed RPMI medium as a positive control for NETosis. Then, neutrophils were seeded into a black 96-well plate and stimulated with 25nM phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA; Sigma-Aldrich) for three hours in a humidified incubator (37 °C) or remained unstimulated as a control. Next, cells were collected by centrifugation and supernatant was stained with SytoxTM Green nucleic acid stain (5 μM; Invitrogen, Eugene, OR, USA) for 20 min. The relative fluorescence was then read with a fluorometer Infinite M200 Pro Microplate reader (Tecan Group, Männedorf, Switzerland) with a filter setting of 485 nm (excitation)/520 nm (emission). Fluorescence intensity reflects the amount of DNA. Results were expressed as relative fluorescence units (RFUs). Endogenous pleural DNA was measured by basal pleural emission (without cells) and subtracted from pleural fluid culture wells.

2.5. Measurement of Oxidative Burst in the Presence of Cell-Free Pleural Fluids

Isolated neutrophils from healthy donors (2×10^4 cells) were cultured in the presence of HBSS medium containing 25% of cf-MPE-LAC, 25% cf-PE-HF or 2% BSA as a control [22]. Briefly, cells were first incubated in the presence of dihydrorhodamine 123 (DHR; Sigma-Aldrich) for 10 min and then stimulated with PMA (325 nM; Sigma Aldrich) for 30 min or remained unstimulated in a humidified incubator (37 °C). ROS production was measured by oxidation of DHR to rhodamine by flow cytometry. Data were expressed as oxidative burst indexes (MFI of DHR under pleural fluid culture conditions divided by the respective nonpleural fluid culture control).

2.6. Induction of Neutrophil Apoptosis in the Presence of Cell-Free Pleural Fluids

Healthy neutrophils (1×10^6 cells) were cultured in RPMI medium supplemented with 25% of cf-MPE-LAC or cf-PE-HF for 24 h. Neutrophils (1×10^6 cells) were also cultured in RPMI to have spontaneous apoptosis. After 24 h, neutrophils were stained with anti-CD66b-PE mAb (BioLegend, clone G10F5) for 15 min and washed with PBS. Subsequently, cells were resuspended in 100 μL of Annexin V Binding Buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, containing 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂) and stained with 5 μL of

Annexin V-FITC (Immunotools) and 5 μ L propidium iodide (PI, Invitrogen, Eugene, OR) 15 min at RT in the dark. Cells were finally washed with PBS and resuspended in 100 μ L for cytometry acquisition. Viable neutrophils were double negative for Annexin-V and PI. Results were analyzed using FlowJo software version 10.6.1.

2.7. Determination of Biochemical Parameters and Soluble Mediators in Pleural Fluids

Protein and glucose levels, pH, lactate dehydrogenase (LDH), C-reactive protein (CRP), and adenosine deaminase (ADA) measurements in pleural fluids were obtained from routine clinical analysis. Pleural fluid concentration of soluble P-selectin (R&D Systems MN, USA), PD-L1 (Thermo Fisher Scientific, Vienna, Austria), TGF- β 1 (Mabtech, Nacka Strand Sweden), PF4 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), VEGF (Peprotech), CD40L (Peprotech), IL-8 (Mabtech, Nacka Strand, Sweden), MPO (Cloud-Clone, Wuhan, China), lactoferrin (RayBiotech, Peachtree Corners, GA, USA) and MMP-9 (Boster Bio, Pleasanton, CA, USA) were determined by specific ELISAs using standard curves according to the manufacturer's instructions of ELISA kit. Pleural fluids were measured for nitrate and nitrite species using a Total NO and Nitrate/Nitrite Parameter Assay Kit (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions.

2.8. Statistics Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism v7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Data were presented as mean \pm SEM or as the median with interquartile range (IQR) according to the normality of the variables. The Kolmogorov–Smirnov normality test was routinely used. Comparisons of parametric variables between two groups were performed with *T*-test for normally distributed data and Mann–Whitney U test for non-normally distributed data. $p < 0.05$ was considered statistically significant. Correlative studies of NET production and soluble factors were performed using Pearson and Spearman correlation coefficients. Correlation matrices were drawn employing an R package called “corrplot” [23]. The receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was also performed to determine the most accurate diagnostic method to discriminate between MPEs and BPEs. Two step multiple lineal regression was applied to predict survival. In the first step, we run a bivariate correlation to screen for variables that were correlated with survival. Then, collinearity of these variables was analyzed. In the second step, multiple linear regression in Enter method with the variables was applied.

3. Results

3.1. Phenotype of Pleural Neutrophils and Concentration of Neutrophil-Associated Molecules in Pleural Fluids

Absolute numbers of neutrophils were similar in MPE-LAC and PE-HF (Table 2). Flow cytometry analyses revealed that the expression of CD66b, CD16, CD15, and the percentage of CD200R were not statistically different regarding neutrophils from MPE-LAC and PE-HF (Table 2). We also found that the percentages of S100A8/9 positive neutrophils tended to be lower in MPE-LAC than in PE-HF pleural fluids (Table 2).

IL-8 concentration was significantly higher in MPE-LAC than in PE-HF (Figure 1D). Moreover, MPO, lactoferrin, and MMP-9 levels, representative molecules of primary, secondary, and tertiary granules, respectively, were significantly higher in MPE-LAC than in PE-HF (Figure 1A–C). Additionally, we assessed the possible influence of different age of LAC and HF patients on neutrophil activity. We did not observe any correlation between these neutrophil related molecules and the age of the patients (data not shown). We found that nitrate levels were lower in MPE-LAC than in PE-HF (Figure 1E). Free-DNA was significantly higher in MPE-LAC than in PE-HF (Figure 1F). To assess the diagnostic value of these soluble factors, we performed ROC curves using PE-HF as a reference. The area under the curve (AUC) for MPO, lactoferrin, MMP-9, and IL-8 was 0.781 (95% CI: 0.668–0.87; $p < 0.001$), 0.792 (95% CI: 0.676–0.881; $p < 0.001$), 0.79 (95% CI: 0.678–0.877; $p < 0.001$), and 0.903 (95% CI: 0.81–0.961; $p < 0.001$), respectively. The observed sensitivities

were 55.3%, 88.69%, 85.11%, and 93.62% and the specificities were 92%, 62.5%, 72%, and 70.83%, respectively (Supplementary Figure S1A–D).

Table 2. Phenotype of neutrophils present in pleural effusions from HF and LAC.

	PE-HF	MPE-LAC	<i>p</i> Value
Neutrophils (cell/mL)	24,000 (4967–106,120)	21,170 (1491–140,580)	n.s. ¹
Neutrophil phenotype			
CD15 expression (MFI)	48.6 ± 6.5	55.9 ± 10.9	n.s. ²
CD16 expression (MFI)	21.8 ± 3.8	26.2 ± 3.6	n.s. ²
CD66b expression (MFI)	19.2 (14.2–25.3)	22.9 (14.7–26.8)	n.s. ¹
S100A8/9 ⁺ neutrophils (%)	48.5 ± 7.4	31.4 ± 3.8	0.09 ²
CD200R ⁺ neutrophils (%)	5.1 ± 1.9	4.3 ± 0.6	n.s. ²

MFI: mean fluorescence intensity. ¹ Nonparametric Mann–Whitney test; ² *t*-test.

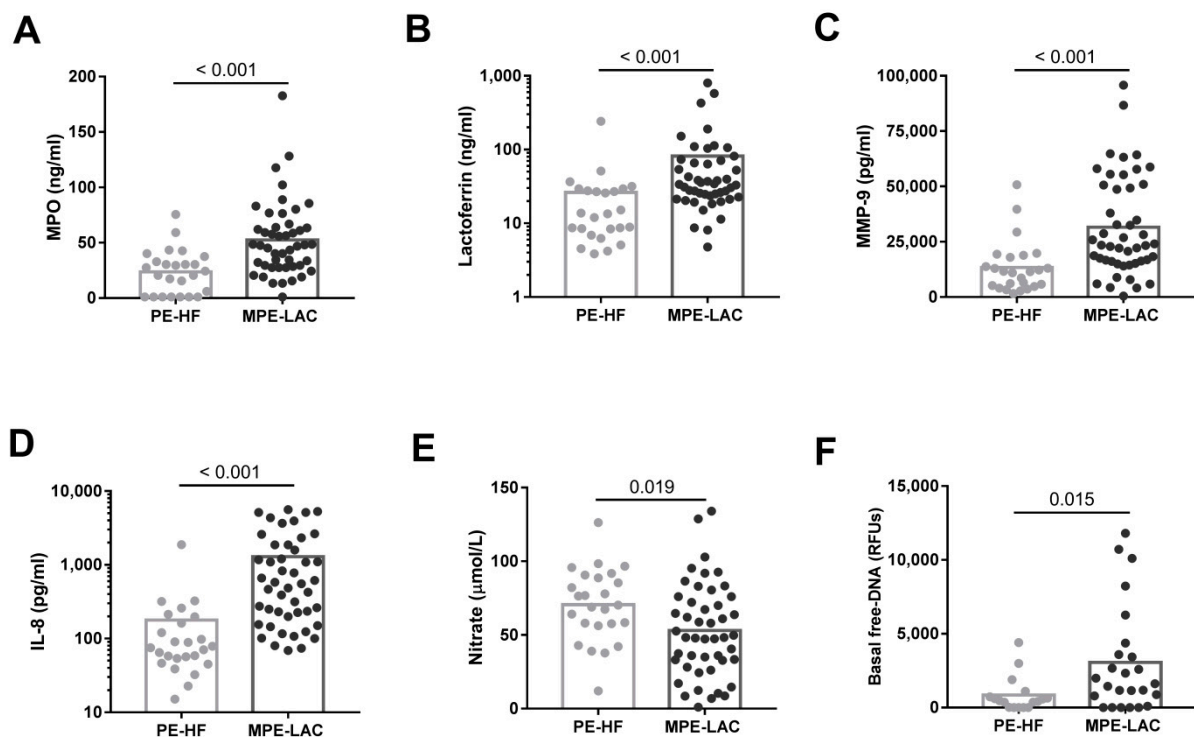


Figure 1. Pleural fluid concentrations of soluble neutrophil-related molecules. Levels of (A) myeloperoxidase (MPO; ng/mL), (B) lactoferrin (ng/mL), (C) matrix metalloproteinase-9 (MMP-9; pg/mL), (D) IL-8 (pg/mL), and (E) nitrate ($\mu\text{mol/L}$) in pleural effusions from heart failure (PE-HF) ($n = 25$) and lung adenocarcinoma (MPE-LAC) ($n = 47$) cell-free pleural fluids determined by the corresponding ELISAs. (F) Pleural extracellular DNA was measured in PE-HF ($n = 17$) and MPE-LAC ($n = 25$) by fluorescence intensity and expressed as relative fluorescence units (RFUs). The unpaired *T*-test (E) and the Mann–Whitney test (A–D), (F) were used for statistical analyses. *P*-values are shown in the graphs.

3.2. Effect of Cell-Free Pleural Fluid on Neutrophil Viability and Function

To assess the influence of pleural fluids on neutrophils, we set up an *ex vivo* 24h-culture with a conditioned medium supplemented with cf-MPE-LAC and cf-PE-HF. We found that the percentage of viable neutrophils was higher in the presence of cf-MPE-LAC than cf-PE-HF (Figure 2A,B). Regarding neutrophil functions, we showed that neutrophils stimulated in the presence of cf-MPE-LAC released more NETs than in the presence of cf-PE-HF (Figure 2C). We also found that neutrophils stimulated in the presence of cf-MPE-LAC exhibited a reduced oxidative burst compared to cf-PE-HF (Figure 2D,E).

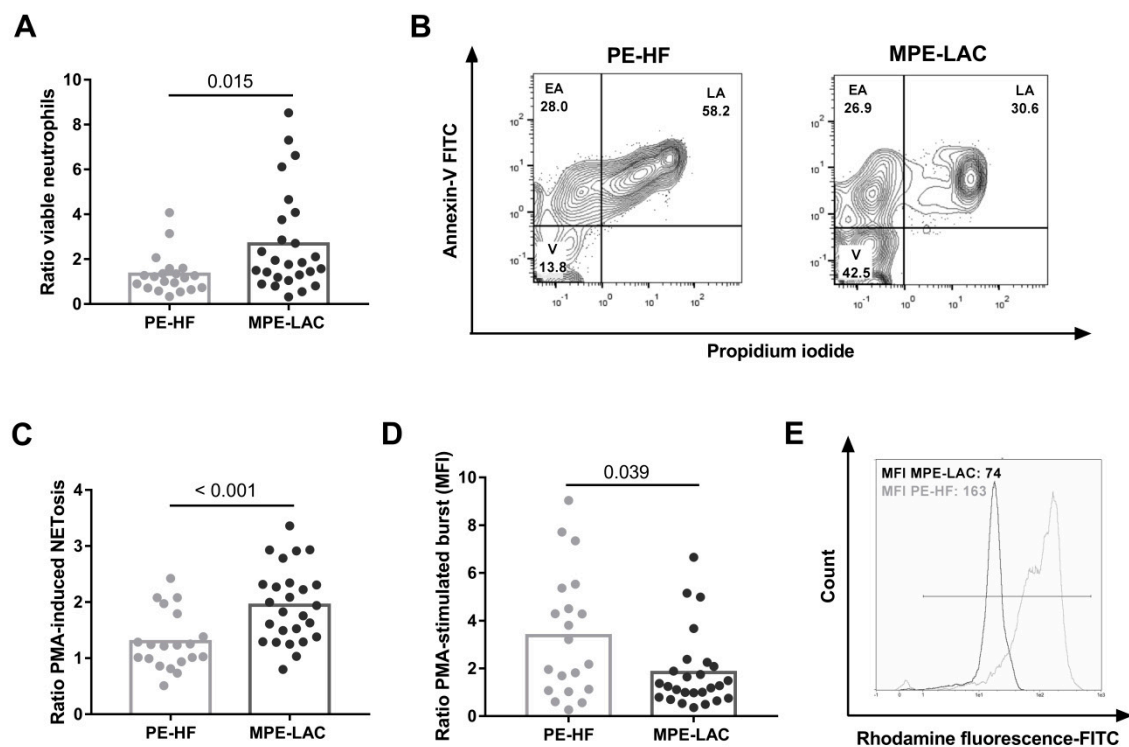


Figure 2. Effect of cell-free pleural fluid on neutrophil viability, NETosis, and oxidative burst. Healthy neutrophils were cultured in the presence of pleural fluids (25% of volume). Viability and oxidative burst capacity were determined by flow cytometry and NET formation was measured by fluorescence. (A) The viability of neutrophils in the presence of pleural effusions from heart failure (PE-HF) ($n = 20$) and lung adenocarcinoma (MPE-LAC) ($n = 26$). Data were expressed as ratios calculated by dividing PE-HF or MPE-LAC values by their respective medium values. (B) Representative flow cytometry plots of apoptosis assay of neutrophils cultured with cf-PE-HF and cf-MPE-LAC. Quadrants are V for viable cells, EA for early apoptosis, and LA for late apoptotic cells. (C,D) Capacity of PE-HF ($n = 20$) and MPE-LAC ($n = 26$) to trigger NET formation and oxidative burst, respectively, under PMA-stimulation conditions. Data were expressed as ratios calculated by dividing PE-HF or MPE-LAC values by their respective control medium values. (E) Representative flow cytometry histograms of ROS production of neutrophils cultured in the presence of cf-PE-HF (grey line) or MPE-LAC (black line). The Mann–Whitney test was used for statistical analyses. P -values are shown in the graphs.

3.3. Association between Immunomodulatory Factors in Pleural Fluid and Neutrophil Function

To decipher neutrophil response in MPEs, we correlated neutrophil functions induced by conditioned culture and soluble molecules in pleural fluids. We found that NETosis was positively associated with MMP-9 in both types of pleural fluids (Figure 3A–D). In PE-HF conditioned cultures, NETosis was also positively associated with MPO (Figure 3A,C). In MPE-LAC conditioned cultures, the viability of neutrophils was positively associated with levels of MPO and negatively associated with nitrite (Figure 3B,D).

We have previously found an altered concentration of platelet derived factors in MPE-LAC. Considering the role of platelets in the modulation of neutrophil response, we analyzed the relationship between PF4, P-selectin, sCD40L, sPD-L1, TGF- β , and VEGF and neutrophil functions. In regard to the NETs induced by conditioned culture, we found a positive correlation with PF4 concentration in cf-PE-HF (Figure 3A,C) and a positive correlation with P-selectin and sPD-L1 in cf-MPE-LAC (Figure 3B,D). We did not find significant associations between oxidative burst and neutrophil viability with platelet-derived factors in either cf-PE-HF patients or cf-MPE-LAC (Figure 3A,B).

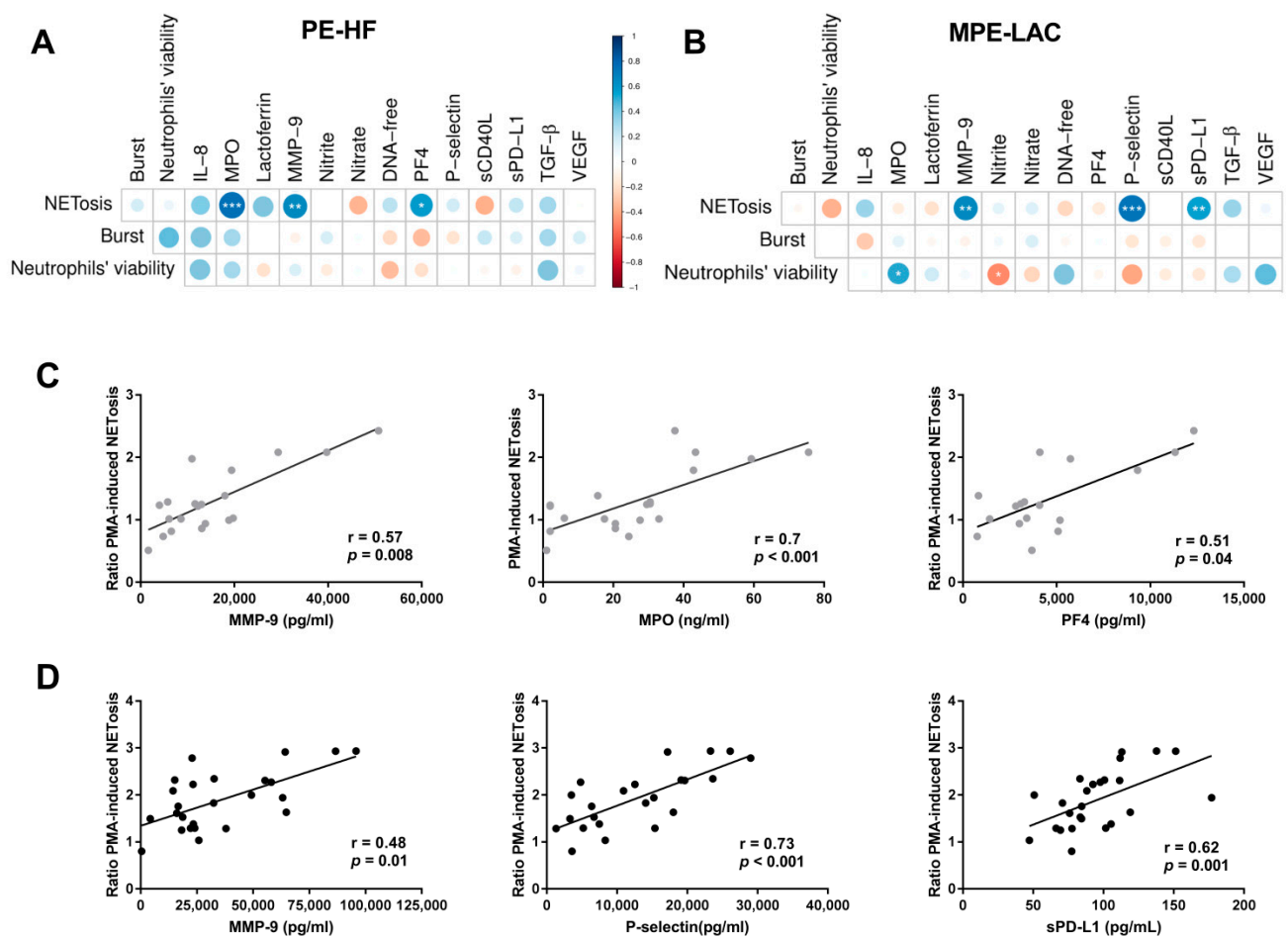


Figure 3. Correlation matrixes between neutrophil functions and platelet and neutrophil-derived factors in cf-PFs. Correlation matrices showing the association between neutrophil- and platelet-derived factors and neutrophils functions in (A) PE-HF and (B) MPE-LAC. The strength and direction of the correlations are indicated by the circle size and color. The statistical significance was represented by (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, and (***) $p < 0.001$. Spearman correlations were established (C) between NETosis and the levels of MPO, MMP-9, and PF4 in cf-PE-HF and (D) between NETosis and the levels of lactoferrin and sPD-L1 in cf-MPE-LAC. The Pearson correlation was used for the correlation between NETosis and P-selectin.

3.4. Association between Neutrophil Functions and the Clinical Outcome of LAC Patients

We analyzed the relationship between neutrophil functions and inflammation parameters. Pleural levels of LDH and CRP were correlated with the pleural concentration of MPO, MMP-9, and lactoferrin in LAC patients with MPE (Figure 4). However, we did not find any correlation between either LDH or CRP and NETosis or oxidative burst induced by cf-MPE-LAC (data not shown). The presence of tumor cells was positively correlated with pleural levels of MMP-9 (Figure 5A) but negatively correlated with pleural levels of lactoferrin (Figure 5B).

In regard to the clinical outcome, levels of lactoferrin were positively correlated with days of survival after MPE diagnosis (Figure 5C). In contrast, PMA-induced NETosis in conditioned cf-MPE-LAC culture was negatively correlated with days of survival after MPE diagnosis (Figure 5D). We did not find any correlation between days of survival after MPE diagnosis and other degranulation products or oxidative burst (data not shown). A two-step multiple linear regression was run to determine how much variance of survival was explained by lactoferrin and PMA-induced NETosis and their intercorrelated variables (MPO and MMP-9, respectively). These 4 variables significantly predicted survival $F(4, 12) = 6.039$, $p < 0.007$, adjusted $R^2 = 0.557$. Regarding 180-day survival, a useful time-

point in MPE to assess the evolution of these patients [24,25], we found that nonsurvivor patients had a greater capacity to induce NETosis (Figure 5E).

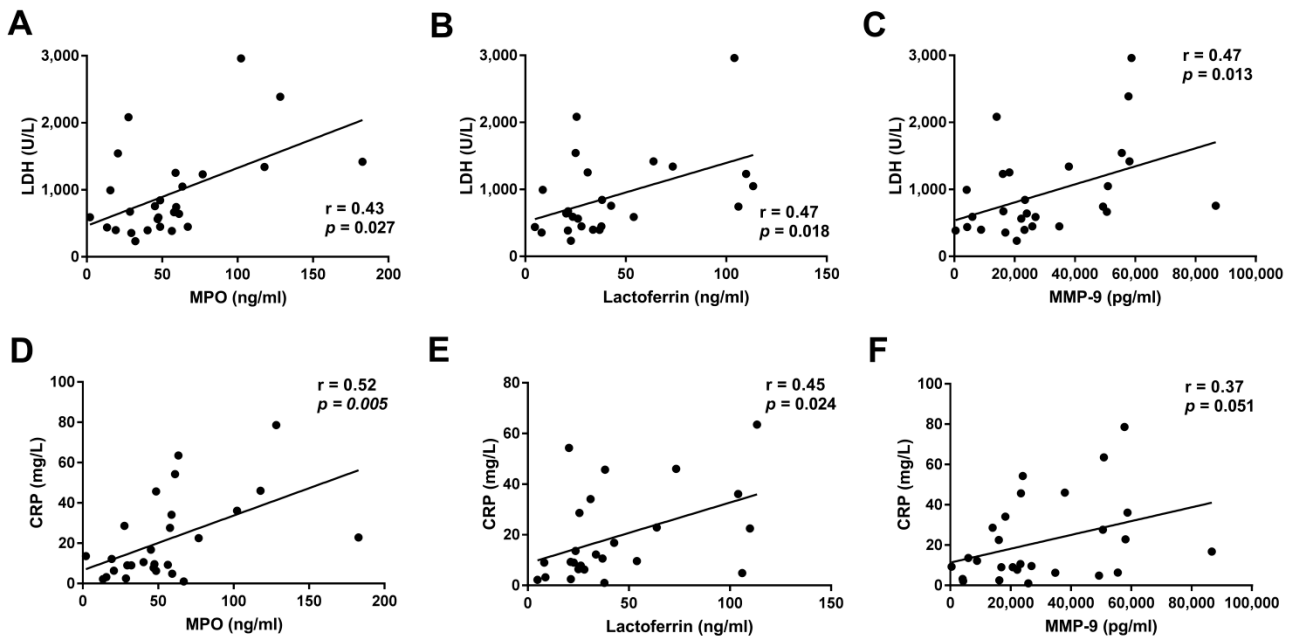


Figure 4. Correlation between paraclinical parameters and the pleural concentration of neutrophil-derived products in LAC patients with MPE. Positive correlation between (A–C) LDH (U/L) or (D–F) CRP (mg/L) and levels of MPO (ng/mL), lactoferrin (ng/mL) and MMP-9 (pg/mL). *R* and *p* values were calculated using Spearman’s correlation coefficient.

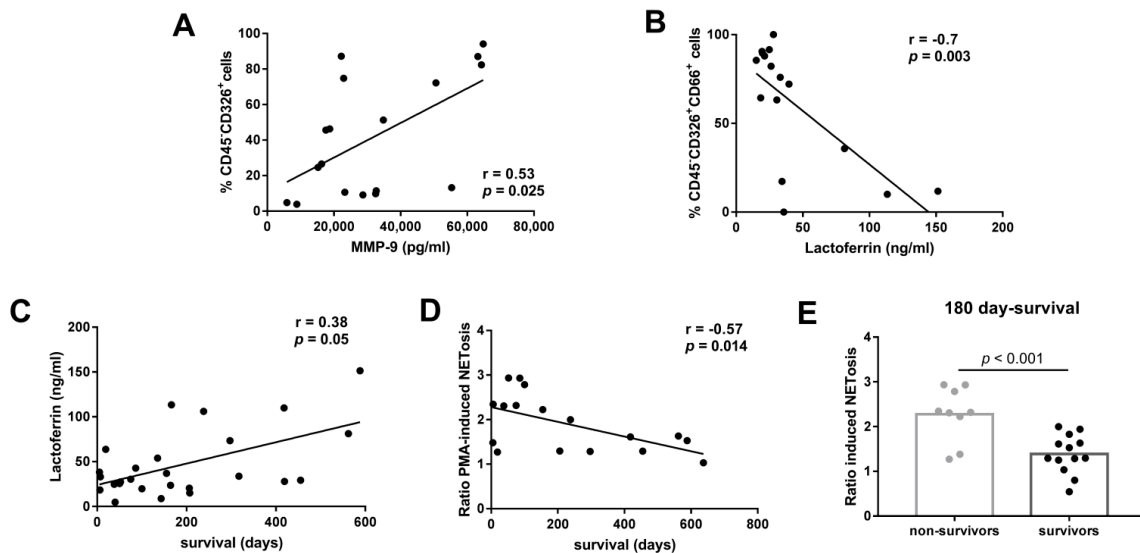


Figure 5. Association between pleural neutrophil-related factors and functions and LAC patient survival. Correlations between the percentage of tumor cells and pleural levels of (A) MMP-9 (pg/mL) and (B) lactoferrin (ng/mL). (C) Spearman positive correlation between pleural lactoferrin levels (ng/mL) and survival days after MPE diagnosis in LAC patients. (D) Pearson negative correlation between PMA-induced cf-PE NETosis and survival days after MPE diagnosis. (E) Comparison of 180-day survival of LAC patients based on the ability of their pleural fluids to induce NETosis. Correlation coefficients and *p*-values are presented in the graphs. The unpaired *t*-test was used for the statistical analysis of 180-day survival. NETosis-related data are expressed as ratios calculated by dividing LAC values by their respective medium values.

4. Discussion

This study shows that MPE-LAC, but not PE-HF, enhance neutrophil survival and NET formation but reduce the oxidative burst capacity of neutrophils. We found higher levels of neutrophil degranulation products in MPE-LAC than in PE-HF. The increased NET production induced by MPEs was associated with higher levels of certain neutrophil- and platelet-derived products and a worse outcome for LAC patients.

We found higher levels of MPO, lactoferrin, and MMP-9 in MPE-LAC than in PE-HF. The ROC curves of these molecules displayed high sensitivity and specificity to discriminate MPE-LAC and PE-HF. Since these molecules are mostly neutrophil derived, it is likely that there is an increased activity of neutrophils in the metastatic pleural compartment of LAC patients. In line with our findings, several reports have shown that MPO and MMP-9 concentrations in neoplastic effusions are higher than in transudates [26,27]. Hegnhøj et al. also found that lactoferrin levels tended to be higher in MPEs from carcinomas and mesotheliomas than in PE-HF [28]. We additionally observed correlations between the concentrations of different degranulation products depending on pleural effusion etiology. Concretely, MMP-9 correlated with MPO and lactoferrin in PE-HF but not in MPE-LAC. It is likely that the release of these three molecules is coordinated in HF but not in LAC. This lack of coordination in MPE may contribute to the dysregulation of NETosis induced by LAC pleural fluids. Additional correlations found between degranulation products and LDH and CRP in MPE-LAC point to the crucial role played by neutrophils in malignancy-induced local inflammation.

Although there are comparable counts of neutrophils in MPE-LAC and PE-HF [5], three current findings, detailed below, would seem to predict higher counts in MPE-LAC than in PE-HF. First, higher levels of degranulation products in MPE-LAC than in PE-HF were seen. However, more neutrophil-derived molecules do not necessarily mean higher counts of neutrophils, but rather more activity per neutrophil. Second, the ROC curve with IL-8 showed the highest sensitivity and specificity to discriminate between MPE-LAC and PE-HF. Nevertheless, like other authors, we found no correlation between the absolute numbers of neutrophils and IL-8 levels (data not shown, [29]). In fact, pleural neutrophil recruitment is an action with complex requirements. Thirdly and finally, neutrophils cultured with MPE-LAC displayed reduced apoptosis. Lifespan may also have affected neutrophil counts. Several molecules in MPEs may be delaying neutrophil apoptosis [30], as indicated by the positive correlation found between levels of MPO and neutrophil viability in MPE-LAC. MPO, mainly produced by neutrophils, can exert a positive feedback via CD11b/CD18 to maintain their survival as previously suggested by El Kebir et al. [31]. Platelets and their derived factors have also been proposed as apoptosis-delaying agents [32], though in the current study, we did not observe a correlation between the viability of neutrophils and platelet-derived mediators. We cannot discard that additional factors, such as GM-CSF, G-CSF, IL-1 β , and IFN- γ [33], modulate neutrophil apoptosis in MPE.

Our results indicate that neutrophils perform a different function in the presence of malignant and nonmalignant pleural fluids. It should be highlighted that the different age between HF and LAC patients does not have influence on neutrophil function because experiments were performed with cells from healthy donors. In our approach, we found that NET formation was higher when neutrophils were cultured with cf-MPE-LAC than with cf-PE-HF. This result is consistent with the observed higher levels of extracellular DNA in MPEs than in PE-HF since neutrophils undergoing NETosis are a possible source of extracellular DNA. However, we did not find any correlation between extracellular DNA and NETosis. DNA can also be originated by the death of inflammatory and tumor cells [34], reducing the correlation between DNA extracellular and NETosis. It is interesting to note that Twaddell and colleagues observed more extracellular DNA in malignant pleural fluids than in transudates but without differences in the levels of citrullinated histone 3 [35]. A possible explanation for this discrepancy with our studies is the method used for the quantification of NETs. While we directly quantified NET formation, they measured the levels of a NET protein. Another possible explanation is that we analyzed the functional

capacity of PMA-stimulated neutrophils to release NETs in the presence of MPE-LAC while they determined a single marker as a surrogate of NET formation in MPEs.

Positive correlations between MMP-9, P-selectin, and PD-L1 with NETosis in MPE-LAC were found in our study. These findings are not surprising since MMP-9 is a component of DNA webs [36,37]. P-selectin primes neutrophils to undergo NETosis by binding to PSGL-1 [38] and NETs can express PD-L1 [39]. Since we also found a positive correlation between MMP-9 and the percentage of tumor cells, it is tempting to speculate that MMP-9 created a positive feedback, activating neutrophils to release NETs, and thereby favoring tumor progression [40,41]. On the other hand, lactoferrin tended to be negatively correlated with NETosis and, according to Okubo et al., this is possible because lactoferrin can inhibit NET formation without affecting ROS production [42].

We showed that cf-MPE-LAC induced more NETosis but less ROS than cf-PE-HF. This unexpected result has several explanations. It has been reported that one type of NETosis, called lytic NETosis, depends on ROS production by NADPH oxidase complex, though another, called vital NETosis, is faster and NADPH independent [43]. However, in our system we cannot distinguish the NETosis type. It has been described that PMA induces lytic NETosis, but we also cultured neutrophils with cf-MPE-LAC and cf-PE-HF without PMA stimulation and obtained comparable results (data not shown). In addition, the flow cytometry technique that we applied to measure ROS production reflects H_2O_2 accumulated inside the cell as a result of the oxidation of DHR to rhodamine [44]. Due to increased levels of MPO, H_2O_2 may be more rapidly converted to hypochlorous acid in MPE-LAC than in PE-HF. Other nonexclusive explanations are that NET production and ROS require different incubation times and the contribution of platelet- or tumor-derived exosomes to NET formation [45,46].

We are aware that our study has some limitations. First, we could not directly analyze neutrophils from pleural fluids because they cannot be frozen and thawed. Therefore, our findings with conditioned cultures need further validation with neutrophil pleural fluids. Second, with our experimental system, we cannot determine whether pleural cytokines were originated in pleura microenvironment or if they were transported from circulation. A parallel quantification of plasma and pleural levels in the same patient would provide clues regarding cytokine origin. Third, we cannot ensure about the effect of different anticancer treatments on neutrophils functions, in particular on NETosis as it is frequently unstable. Finally, studies are needed to determine whether our results can be extrapolated to pleural metastases other than lung cancer, such as breast or ovarian carcinomas.

5. Conclusions

In conclusion, our study contributes to a better understanding of the mechanisms implicated in the modulation of the neutrophil response in MPEs. In addition, this is the first study associating NETs with a worse outcome in MPE. Our results suggest that NETs themselves may be potential therapeutic targets. It is necessary to explore further the molecular and cellular mechanisms of NETosis in order to develop accurate targeted therapies that block NETosis or their effects on inflammation and facilitate the identification of patients with a worse prognosis.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/xxx/s1>, Figure S1: Receiver operating characteristic (ROC) curves evaluating the diagnostic value of neutrophil-related factors in differentiating malignant from non-malignant pleural fluids.

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

Funding: This research was partly funded through a collaboration with Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of Research Institute of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP-IR) (protocol code IIBSP-PLE-2014-19 of approval).

Informed Consent Statement: Written informed consent was obtained from all patients involved in the study.

Data Availability Statement: All data relevant to the study are included in the article or uploaded as Supplementary Materials. The datasets used and analyzed during the current study are included in the article. They are available from the corresponding author on reasonable request.

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

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Psallidas, I.; Kalomenidis, I.; Porcel, J.M.; Robinson, B.W.; Stathopoulos, G.T. Malignant Pleural Effusion: From Bench to Bedside. *Eur. Respir. Rev.* **2016**, *25*, 189–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Porcel, J.M.; Light, R.W. Pleural Effusions. *Disease-a-Month* **2013**, *59*, 29–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hooper, C.; Lee, Y.C.G.; Maskell, N. Investigation of a Unilateral Pleural Effusion in Adults: British Thoracic Society Pleural Disease Guideline 2010. *Thorax* **2010**, *65*, ii4–ii17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lee, Y.S.; Nam, H.S.; Lim, J.H.; Kim, J.S.; Moon, Y.; Cho, J.H.; Ryu, J.S.; Kwak, S.M.; Lee, H.L. Prognostic Impact of a New Score Using Neutrophil-to-Lymphocyte Ratios in the Serum and Malignant Pleural Effusion in Lung Cancer Patients. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 557. [[CrossRef](#)]
- Nieto, J.C.; Zamora, C.; Porcel, J.M.; Mulet, M.; Pajares, V.; Muñoz-Fernandez, A.M.; Calvo, N.; Espinosa, I.; Pascual-García, M.; Bielsa, S.; et al. Migrated T Lymphocytes into Malignant Pleural Effusions: An Indicator of Good Prognosis in Lung Adenocarcinoma Patients. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 2996. [[CrossRef](#)]
- Broadbush, V.C.; Hébert, C.A.; Vitangcol, R.V.; Hoeffel, J.M.; Bernstein, M.S.; Boylan, A.M. Interleukin-8 is a major neutrophil chemotactic factor in pleural liquid of patients with empyema. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1992**, *146*, 825. [[CrossRef](#)]
- Bağcı Ceyhan, B.; Özgün, S.; Çelikel, T.; Yalçın, M.; Koç, M. IL-8 in Pleural Effusion. *Respir. Med.* **1996**, *90*, 215–221. [[CrossRef](#)]
- Pace, E.; Profita, M.; Melis, M.; Bonanno, A.; Paternò, A.; Mody, C.H.; Spatafora, M.; Ferraro, M.; Siena, L.; Vignola, A.M.; et al. LTB4 Is Present in Exudative Pleural Effusions and Contributes Actively to Neutrophil Recruitment in the Inflamed Pleural Space. *Clin. Exp. Immunol.* **2004**, *135*, 519–527. [[CrossRef](#)]
- Liu, G.N.; Shi, H.Z.; Xie, Z.H.; Shen, H.H.; Huang, H.Q.; Deng, J.M.; Liang, Q.L.; Wu, Y.B. Epithelial Neutrophil-Activating Peptide-78 Recruits Neutrophils into Pleural Effusion. *Eur. Respir. J.* **2009**, *34*, 184–190. [[CrossRef](#)]
- Furumaya, C.; Martinez-Sanz, P.; Bouti, P.; Kuijpers, T.W.; Matlung, H.L. Plasticity in Pro- and Anti-Tumor Activity of Neutrophils: Shifting the Balance. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 2100. [[CrossRef](#)]
- Singel, K.L.; Emmons, T.R.; Khan, A.N.H.; Mayor, P.C.; Shen, S.; Wong, J.T.; Morrell, K.; Eng, K.H.; Mark, J.; Bankert, R.B.; et al. Mature Neutrophils Suppress T Cell Immunity in Ovarian Cancer Microenvironment. *JCI Insight* **2019**, *4*, e122311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Masucci, M.T.; Minopoli, M.; Carriero, M.V. Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 1146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Houghton, A.M.G.; Rzymkiewicz, D.M.; Ji, H.; Gregory, A.D.; Egea, E.E.; Metz, H.E.; Stolz, D.B.; Land, S.R.; Marconcini, L.A.; Kliment, C.R.; et al. Neutrophil Elastase-Mediated Degradation of IRS-1 Accelerates Lung Tumor Growth. *Nat. Med.* **2010**, *16*, 219–223. [[CrossRef](#)]
- Merchant, N.; Nagaraju, G.P.; Rajitha, B.; Lammata, S.; Jella, K.K.; Buchwald, Z.S.; Lakka, S.S.; Ali, A.N. Matrix Metalloproteinases: Their Functional Role in Lung Cancer. *Carcinogenesis* **2017**, *38*, 766–780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Olsson, A.K.; Cedervall, J. NETosis in Cancer—Platelet-Neutrophil Crosstalk Promotes Tumor-Associated Pathology. *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 373. [[CrossRef](#)]
- Keshari, R.S.; Jyoti, A.; Dubey, M.; Kothari, N.; Kohli, M.; Bogra, J.; Barthwal, M.K.; Dikshit, M. Cytokines Induced Neutrophil Extracellular Traps Formation: Implication for the Inflammatory Disease Condition. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e48111. [[CrossRef](#)]

17. Sørensen, O.E.; Borregaard, N. Neutrophil Extracellular Traps—The Dark Side of Neutrophils. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 1612–1620. [[CrossRef](#)]
18. Ireland, A.S.; Oliver, T.G. Neutrophils Create an ImpeNETrable Shield between Tumor and Cytotoxic Immune Cells. *Immunity* **2020**, *52*, 729–731. [[CrossRef](#)]
19. Albregues, J.; Shields, M.A.; Ng, D.; Park, C.G.; Ambrico, A.; Poindexter, M.E.; Upadhyay, P.; Uyeminami, D.L.; Pommier, A.; Küttner, V.; et al. Neutrophil Extracellular Traps Produced during Inflammation Awaken Dormant Cancer Cells in Mice. *Science* **2018**, *361*, eaao4227. [[CrossRef](#)]
20. Knaapen, A.M.; Gungör, N.; Schins, R.P.F.; Borm, P.J.A.; Van Schooten, F.J. Neutrophils and Respiratory Tract DNA Damage and Mutagenesis: A Review. *Mutagenesis* **2006**, *21*, 225–236. [[CrossRef](#)]
21. Mantovani, A.; Marchesi, F.; Malesci, A.; Laghi, L.; Allavena, P. Tumour-Associated Macrophages as Treatment Targets in Oncology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2017**, *14*, 399–416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Nieto, J.C.; Perea, L.; Soriano, G.; Zamora, C.; Cantó, E.; Medina, A.; Poca, M.; Sanchez, E.; Roman, E.; Julià, G.; et al. Ascitic Fluid Regulates the Local Innate Immune Response of Patients with Cirrhosis. *J. Leukoc. Biol.* **2018**, *104*, 833–841. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Wei, T.; Simko, V.; Levy, M.; Xie, Y.; Jin, Y.; Zemla, J. Package ‘corrplot’. *Statistician* **2017**, *56*, e24.
24. Warner, A.; Dahele, M.; Hu, B.; Palma, D.A.; Senan, S.; Oberije, C.; Tsujino, K.; Moreno-Jimenez, M.; Kim, T.H.; Marks, L.B.; et al. Factors Associated with Early Mortality in Patients Treated with Concurrent Chemoradiation Therapy for Locally Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2016**, *94*, 612–620. [[CrossRef](#)]
25. Mulet, M.; Zamora, C.; Porcel, J.M.; Nieto, J.C.; Pajares, V.; Muñoz-Fernandez, A.M.; Calvo, N.; Esquerda, A.; Vidal, S. Platelet Factor 4 Regulates T Cell Effector Functions in Malignant Pleural Effusions. *Cancer Lett.* **2020**, *491*, 78–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Segura, R.M.; Alegre, J.; Varela, E.; Marti, R.; Suriñach, J.M.; Jufresa, J.; Armadans, L.; Pascual, C.; De Sevilla, T.F. Interleukin-8 and Markers of Neutrophil Degranulation in Pleural Effusions. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1998**, *157*, 1565–1572. [[CrossRef](#)]
27. Park, K.J.; Hwang, S.C.; Sheen, S.S.; Oh, Y.J.; Han, J.H.; Lee, K.B. Expression of Matrix Metalloproteinase-9 in Pleural Effusions of Tuberculosis and Lung Cancer. *Respiration* **2005**, *72*, 166–175. [[CrossRef](#)]
28. Hegnhøj, J.; Galloee, A. Diagnostic Value of Lactoferrin Analysis in Pleural Effusions. *Clin. Chem. Lab. Med.* **1994**, *32*, 521–524. [[CrossRef](#)]
29. Pace, E.; Gjomarkaj, M.; Melis, M.; Profita, M.; Spatafora, M.; Vignola, A.M.; Bonsignore, G.; Mody, C.H. Interleukin-8 Induces Lymphocyte Chemotaxis into the Pleural Space Role of Pleural Macrophages. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1999**, *159*, 1592–1599. [[CrossRef](#)]
30. Brostjan, C.; Oehler, R. The Role of Neutrophil Death in Chronic Inflammation and Cancer. *Cell Death Discov.* **2020**, *6*, 26. [[CrossRef](#)]
31. El Kebir, D.; József, L.; Pan, W.; Filep, J.G. Myeloperoxidase Delays Neutrophil Apoptosis through CD11b/CD18 Integrins and Prolongs Inflammation. *Circ. Res.* **2008**, *103*, 352–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Andonegui, G.; Trevani, A.S.; López, D.H.; Raiden, S.; Giordano, M.; Geffner, J.R. Inhibition of Human Neutrophil Apoptosis by Platelets. *J. Immunol.* **1997**, *158*, 3372–3377. [[PubMed](#)]
33. Colotta, F.; Re, F.; Polentarutti, N.; Sozzani, S.; Mantovani, A. Modulation of Granulocyte Survival and Programmed Cell Death by Cytokines and Bacterial Products. *Blood* **1992**, *80*, 2012–2020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. De Souza, A.G.; Bastos, V.A.F.; Fujimura, P.T.; Ferreira, I.C.C.; Leal, L.F.; da Silva, L.S.; Laus, A.C.; Reis, R.M.; Martins, M.M.; Santos, P.S.; et al. Cell-Free DNA Promotes Malignant Transformation in Non-Tumor Cells. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 21674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Twaddell, S.H.; Gibson, P.G.; Grainge, C.; Baines, K.J. Parapneumonic Effusions Are Characterized by Elevated Levels of Neutrophil Extracellular Traps. *Chest* **2021**, *160*, 1645–1655. [[CrossRef](#)]
36. Carmona-Rivera, C.; Zhao, W.; Yalavarthi, S.; Kaplan, M.J. Neutrophil Extracellular Traps Induce Endothelial Dysfunction in Systemic Lupus Erythematosus through the Activation of Matrix Metalloproteinase-2. *Ann. Rheum. Dis.* **2015**, *74*, 1417–1424. [[CrossRef](#)]
37. Chen, Y.; Han, L.; Qiu, X.; Wang, G.; Zheng, J. Neutrophil Extracellular Traps in Digestive Cancers: Warrior or Accomplice. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 4914. [[CrossRef](#)]
38. Etulain, J.; Martinod, K.; Wong, S.L.; Cifuni, S.M.; Schattner, M.; Wagner, D.D. P-Selectin Promotes Neutrophil Extracellular Trap Formation in Mice. *Blood* **2015**, *126*, 242–246. [[CrossRef](#)]
39. Kaltenmeier, C.; Yazdani, H.O.; Morder, K.; Geller, D.A.; Simmons, R.L.; Tohme, S. Neutrophil Extracellular Traps Promote T Cell Exhaustion in the Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 785222. [[CrossRef](#)]
40. Ardi, V.C.; Kupriyanova, T.A.; Deryugina, E.I.; Quigley, J.P. Human Neutrophils Uniquely Release TIMP-Free MMP-9 to Provide a Potent Catalytic Stimulator of Angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 20262–20267. [[CrossRef](#)]
41. Barillari, G. The Impact of Matrix Metalloproteinase-9 on the Sequential Steps of the Metastatic Process. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Okubo, K.; Kamiya, M.; Urano, Y.; Nishi, H.; Herter, J.M.; Mayadas, T.; Hirohama, D.; Suzuki, K.; Kawakami, H.; Tanaka, M.; et al. Lactoferrin Suppresses Neutrophil Extracellular Traps Release in Inflammation. *EBioMedicine* **2016**, *10*, 204–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Sofoluwe, A.; Bacchetta, M.; Badaoui, M.; Kwak, B.R.; Chanson, M. ATP Amplifies NADPH-Dependent and -Independent Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 16556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

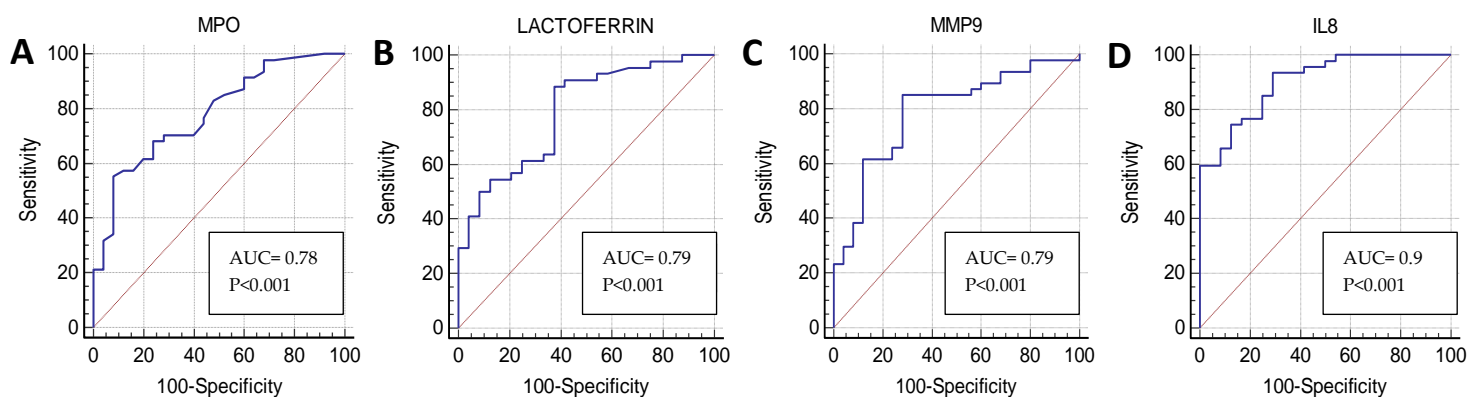
44. Elbim, C.; Lizard, G. Flow Cytometric Investigation of Neutrophil Oxidative Burst and Apoptosis in Physiological and Pathological Situations. *Cytom. Part A* **2009**, *75*, 475–481. [[CrossRef](#)]
45. Jiao, Y.; Li, W.; Wang, W.; Tong, X.; Xia, R.; Fan, J.; Du, J.; Zhang, C.; Shi, X. Platelet-Derived Exosomes Promote Neutrophil Extracellular Trap Formation during Septic Shock. *Crit. Care* **2020**, *24*, 380. [[CrossRef](#)]
46. Leal, A.C.; Mizurini, D.M.; Gomes, T.; Rochael, N.C.; Saraiva, E.M.; Dias, M.S.; Werneck, C.C.; Sielski, M.S.; Vicente, C.P.; Monteiro, R.Q. Tumor-Derived Exosomes Induce the Formation of Neutrophil Extracellular Traps: Implications For The Establishment of Cancer-Associated Thrombosis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6438. [[CrossRef](#)]

1 *Supplementary materials*

2 **Association of NETosis in malignant pleural fluids and poor**
 3 **outcomes in lung adenocarcinoma patients**

4 **Maria Mulet, Rubén Osuna-Gómez, Carlos Zamora, José M. Porcel, Juan C. Nieto, Lía Perea, Virginia Pajares,**
 5 **Ana M. Muñoz-Fernandez, Nuria Calvo, M. Alba Sorolla and Silvia Vidal**

6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35



Supplementary Figure 1. Receiver operating characteristic (ROC) curves evaluating the diagnostic value of neutrophil-related factors in differentiating malignant from non-malignant pleural fluids. ROC curves were performed for (A) MPO, (B) lactoferrin, (C) MMP-9 and (D) IL-8 and their respective AUC and p-values are presented in the figure. AUC, Area under the curve.

5. RESUM GLOBAL DE RESULTATS I DISCUSSIÓ

5.1. ARTICLE 1.1

Platelet factor 4 regulates T cell effector functions in malignant pleural effusions

Maria Mulet, Carlos Zamora, José M Porcel, Juan C Nieto, Virginia Pajares, Ana M Muñoz-Fernandez, Núria Calvo, Aureli Esquerda, Silvia Vidal

Cancer Letters. 2020 Oct; 28(491):78-86.

5.1.1. Resum global dels resultats

El VPM es defineix com l'acumulació de líquid en la cavitat pleural acompanyat de cèl·lules tumorals i és una complicació comuna en pacients amb càncers en estadis avançats. L'aparició d'un VPM acostuma a estar associada a un mal pronòstic i els tractaments disponibles són més aviat pal·liatius. Així doncs, es necessita disposar de biomarcadors que ajudin a predir l'evolució d'aquests pacients. Progressivament, s'han anat ampliant els coneixements sobre les interaccions que es produeixen entre les cèl·lules tumorals i el sistema immunitari en el microambient tumoral del VPM. En aquest context, els limfòcits T citotòxics són els encarregats de destruir les cèl·lules tumorals principalment a través de l'alliberació de granzims i perforines.

Donada la importància dels limfòcits T en el microambient tumoral, l'objectiu principal del treball ha estat estudiar l'efecte del VPM sobre les funcions d'aquestes cèl·lules. Amb aquest propòsit, s'han identificat molècules immunomoduladores, especialment aquelles derivades de la plaqueta, que presentaven una concentració alterada en el VPM i s'han associat amb les funcions dels limfòcits T. Aquest treball també ha tingut com a objectiu secundari l'avaluació del valor pronòstic d'aquestes molècules immunomoduladores.

L'estudi va incloure 35 pacients amb VPM derivat d'adenocarcinoma pulmonar i 20 pacients presentaven VPB derivat de IC com a control no-maligne. Els líquids pleurals es van obtenir per toracocentesis rutinàries i la presència de cèl·lules tumorals es va determinar per citometria de flux. Els líquids pleurals es van centrifugar per tal de separar-ne el contingut cel·lular. Un cop lliures de cèl·lules, es van analitzar molecularment i es van fer servir per estudiar-ne l'efecte sobre les funcions dels limfòcits T. En paral·lel, es van recollir mostres de plasma d'alguns dels pacients inclosos en l'estudi per determinar l'associació entre els nivells pleurals i sistèmics d'alguns dels factors amb concentracions alterades.

Per estudiar l'efecte dels líquids pleurals sobre les funcions dels limfòcits T, es va dissenyar un model de cultiu *in vitro* on s'estimulaven PBMCs, aïllades de la sang de donants sans, amb un kit d'activació de limfòcits T en presència de medi suplementat amb el 25% de VPM o VPB. Es va observar que els limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺ estimulats en presència de VPMs presentaven una capacitat proliferativa i citotòxica reduïda en comparació amb els limfòcits T estimulats en presència de VPBs. En particular, l'expressió de granzim B, però no la de perforina, era menor en els limfòcits T cultivats amb VPMs. Pel que fa a la producció de citocines, els nivells de IL-17 disminuïen significativament, mentre que els de IL-10 tendien a augmentar i els d'IFN- γ a disminuir en presència de VPMs en comparació amb VPBs; afavorint una resposta antiinflamatòria.

Per tal de determinar quines molècules solubles podien estar exercint aquest efecte immunosupressor sobre la resposta dels limfòcits T es va caracteritzar molecularment el microambient tumoral del VPM. Els resultats mostren que els nivells de PF4, TGF- β , VEGF i P-selectina (factors alliberats principalment per la plaqueta) eren més elevats en VPMs en comparació amb VPBs. A més a més, també es van observar que el patró d'associacions entre aquestes molècules variava en funció de l'etiologia del VP. En els VPMs, els nivells de VEGF es correlacionaven positivament amb els nivells de P-selectina i PD-L1 soluble, mentre que els nivells de P-selectina es correlacionaven també amb els de TGF- β . En canvi, en els VPBs, els nivells de VEGF es correlacionaven negativament amb els de P-selectina. No obstant, es mantenia l'associació directa entre els nivells de P-selectina i TGF- β observada en els VPMs i s'afegia una relació directa entre el PF4 i el TGF- β . En referència als nivells sistèmics, tant en pacients amb VPM com amb VPB, les concentracions de PF4 i P-selectina eren més elevades en plasma que en el líquid pleural, però només es correlacionaven entre ells directament en el cas de la P-selectina.

A continuació, es van relacionar les molècules amb concentracions alterades en els VPMs i les funcions dels limfòcits T. Es va veure que els nivells pleurals de PF4 es correlacionaven negativament amb l'activació, la proliferació i l'expressió del granzim B dels limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺. Els nivells de PD-L1 soluble també es correlacionaven negativament amb l'activació i la proliferació dels limfòcits T CD4⁺. L'efecte immunosupressor del PF4 es va validar *in vitro*. En línia amb els resultats anteriors, el PF4 recombinant reduïa la proliferació i l'expressió de granzim B dels limfòcits T. No es van observar diferències en l'expressió de BTLA, LAG-3, PD-L1, PD-1, TIGIT i TIM-3 dels limfòcits T en presència o absència de PF4 recombinant. La producció de IL-10 era significativament major en presència de PF4, mentre que els nivells d'IFN- γ i IL-17 també tendien a ser més elevats.

Finalment, es van analitzar les implicacions clíniques de l'increment de PF4 en el VPM. Els pacients amb concentracions elevades de PF4 en el VPM tenien un pitjor pronòstic, una condició que ja s'observava en la supervivència a curt termini. Aquests resultats suggereixen que la disminució de la resposta dels limfòcits T associada al PF4 estaria facilitat la progressió tumoral.

5.1.2. Discussió i rellevància

El disseny d'un model de cultiu *in vitro* amb líquid pleural ha permès simular el microambient tumoral del VPM facilitant l'estudi de la resposta immunitària dels limfòcits T. La nostra investigació proporciona informació sobre els mecanismes immunosupressors implicats en la modulació de la resposta dels limfòcits T en el VPM. La caracterització molecular d'aquest entorn metastàtic ha permès determinar quins mediadors solubles estan incrementats en el VPM i definir-ne la importància en la modulació de les funcions dels limfòcits T. Així mateix, l'avaluació del potencial d'aquests mediadors com a biomarcadors de pronòstic ha estat clínicament rellevant.

Amb aquest treball, no només hem evidenciat l'efecte immunosupressor del VPM sobre l'activació, la proliferació i la capacitat citotòxica dels limfòcits T, sinó que també hem trobat un possible responsable, el PF4, que participaria limitant la resposta antitumoral dels limfòcits T. El mecanisme pel qual el PF4 modula les funcions dels limfòcits T en el VPM roman desconegut. Una possibilitat és que el PF4 actuï directament sobre els limfòcits T a través del CXCR3^{323,363} o receptors alternatius, com el CCR1 i Mac-1^{324,364}. Una altra possibilitat és que l'efecte sigui indirecte, induint l'expressió de molècules immunosupressores. En concordança amb aquesta hipòtesi, hem vist que el PF4 estimula la producció de IL-10, dirigint la resposta dels limfòcits T cap a un perfil antiinflamatori. Seria interessant validar els resultats obtinguts analitzant les funcions dels limfòcits T frescos aïllats directament del líquid pleural.

Clínicament, els nivells de PF4 es troben augmentats en el VPM, i, a més a més, s'associen a un mal pronòstic. Aquestes troballes suggereixen que aquesta molècula derivada de la plaqueta podria ser un biomarcador no invasiu de mal pronòstic pels pacients amb VPM derivat d'adenocarcinoma pulmonar. En línia amb aquests descobriments, Pucci i col·laboradors havien observat prèviament que la sobreexpressió de PF4 en el tumor primari de pulmó s'associava amb una supervivència reduïda³²⁸. A més a més, Spaks i col·laboradors van trobar que l'increment dels nivells plasmàtics de PF4 en pacients amb CPCNP es relacionava amb l'angiogènesi induïda pel càncer³⁶⁵. Seria interessant comprovar si els resultats són extrapolables a VPMs derivats d'altres malignitats com el càncer de mama o el d'ovari. Donada

la complexitat del microambient tumoral, és possible que el PF4 no sigui l'únic factor que participa en la supressió de la resposta antitumoral dels limfòcits T, podrien haver-n'hi d'altres que estiguessin exercint un efecte sinèrgic. Caldrien experiments addicionals per avaluar si el bloqueig del PF4 permet recuperar la resposta citotòxica dels limfòcits T contra el tumor. Això podria obrir portes al desenvolupament d'anticossos monoclonals dirigits contra PF4 per millorar el pronòstic dels pacients amb VPM, o si més no endarrerir-ne la progressió. Cal tenir present que els resultats obtinguts no poden extrapolar-se al tumor primari de pulmó, ja que el fenotip i les funcions de les cèl·lules immunitàries poden diferir del microambient metastàtic.

5.2. ARTICLE 1.2

Experimental supporting data on the influence of platelet-derived factors of malignant pleural effusions on T cell effector functions and their relevance in predicting prognosis of lung adenocarcinoma patients with pleural metastasis

Maria Mulet*, Carlos Zamora*, José M Porcel, Juan C Nieto, Virginia Pajares, Ana M Muñoz-Fernandez, Núria Calvo, Aureli Esquerda, Silvia Vidal

Data in Brief. 2020 Oct; 32:106266.

5.2.1. Resum global dels resultats

Aquesta publicació presenta resultats complementaris a l'article 1.1. "*Platelet factor 4 regulates T cell effector functions in malignant pleural effusions*" on s'havien quantificat nivells més elevats de PF4 i altres factors plaquetaris en els VPMs en comparació amb els VPBs. La cohort de pacients de l'estudi és la mateixa que en l'article 1.1.; inclou 35 pacients amb VPM derivat d'un adenocarcinoma pulmonar i 20 pacients amb VPB originat per IC. D'aquests pacients se'ls va recollir el líquid pleural per mitjà d'una toracocentesi i en alguns d'ells (11 VPMs i 15 VPBs) també se'n va recollir el plasma. Els líquids pleurals es van centrifugar per obtenir de forma separada les cèl·lules del propi líquid.

El primer objectiu de l'article va ser determinar l'origen del PF4 dels líquids pleurals, ja que en l'article 1.1 havíem vist que participava en la modulació de les funcions dels limfòcits T. Hi ha evidències que demostren que aquesta molècula pot ser produïda en menor quantitat per altres cèl·lules a part de la plaqueta, com els limfòcits³⁶⁶, els monòcits³⁶⁷ i les cèl·lules tumorals³⁶⁸. Així doncs, es va quantificar la producció de PF4 per part de les cèl·lules dels VPMs i es va comparar amb la dels VPBs. Breument, es van cultivar les cèl·lules aïllades dels VPs durant 72 h i es va mesurar la concentració de PF4 dels sobrenedants dels cultius per mitjà de la tècnica ELISA. En paral·lel, es van estimular les cèl·lules aïllades dels VPs amb un kit d'activació dels limfòcits T durant 72 h per tal de quantificar la producció de PF4 per part dels limfòcits presents en els VPs. Tant en condicions espontànies, com en condicions d'activació dels limfòcits T, la producció de PF4 va ser major en els VPMs que en els VPBs. Tot i això, les quantitats produïdes eren molt baixes, pràcticament insignificants en comparació amb els nivells basals de PF4 mesurats en els mateixos VPs. A més a més, els nivells basals de PF4 no es correlaciona amb el nombre de limfòcits T CD4⁺ ni CD8⁺ que hi havia originalment en els VPMs.

El segon objectiu va ser avaluar la influència d'altres factors solubles derivats de la plaqueta, que en l'article 1.1 s'havien vist augmentats en els VPMs, sobre la resposta dels limfòcits T. No es va observar cap mena d'associació entre la concentració de TGF- β , P-selectina i VEGF dels VPMs i la proliferació i l'expressió del granzim B dels limfòcits T.

Finalment, el tercer objectiu va ser determinar si, a banda del PF4, els altres factors plaquetaris mesurats podien ser útils com a predictors de pronòstic en pacients amb VPM. Les corbes de Kaplan-Meier mostraven que els nivells pleurals de TGF- β , P-selectina i VEGF no semblaven influir en la taxa de supervivència global dels pacients amb VPM i que, per tant, no eren bons predictors de pronòstic pels pacients amb VPM derivat d'adenocarcinoma pulmonar.

5.2.2. Discussió i rellevància

Una de les principals troballes d'aquest estudi és que les cèl·lules aïllades dels VPM són capaces de produir PF4 quan s'estimulen amb un kit d'activació dels limfòcits T. Tot i això, no se'n poden considerar la font cel·lular principal perquè els nivells mesurats eren pràcticament insignificants en comparació amb el contingut de PF4 dels líquids pleurals. Altres cèl·lules dels VPMs també eren capaces de produir PF4 de forma espontània però en menor quantitat que els limfòcits T.

Malgrat no poder determinar amb exactitud l'origen del PF4 dels líquids pleurals, es proposen diverses hipòtesis que podrien explicar-ne la procedència. Una possible explicació seria que el PF4 i altres molècules derivades de les plaquetes entressin a la pleura per difusió passiva i es concentrassin en el VPM a causa de l'augment de la permeabilitat prèviament descrit en condicions de metàstasi pleural. Tot i això, aquesta hipòtesi sembla poc probable perquè els nivells plasmàtics de PF4 i P-selectina eren similars en pacients amb adenocarcinoma pulmonar i pacients amb IC, i en ambdós casos superiors que en la cavitat pleural. Una altra possibilitat seria que aquestes molècules entressin a la cavitat pleural en forma de PMPs. Tot i no detectar un nombre significatiu de plaquetes en els líquids pleurals, es van quantificar més PMPs en els VPMs en comparació amb els VPBs. A més a més, s'ha descrit que en patologies amb una inflamació crònica, com és el cas del càncer, el nombre de plaquetes augmenta i també el seu estat d'activació³⁶⁹. Per tant, tenint en compte els resultats obtinguts, la teoria més raonable seria que les plaquetes entressin en el VPM, s'activessin i alliberessin les PMPs que contenen PF4 i altres factors dels grànuls plaquetaris.

Els resultats obtinguts poden ser útils per investigadors i clínics que treballin en el camp de la metàstasi pleura i que estiguin interessats en determinar la importància de les plaquetes i els seus derivats en el VPM. Els resultats obtinguts poden recolzar futures investigacions que explorin les possibles fonts dels factors plaquetaris en el VPM.

5.3. ARTICLE 2

Influence of Malignant Pleural Fluid from Lung Adenocarcinoma Patients on Neutrophil Response

Maria Mulet, Rubén Osuna-Gómez, Carlos Zamora, José M. Porcel, Juan C. Nieto, Lúdia Perea, Virginia Pajares, Ana M. Muñoz-Fernandez, Nuria Calvo, Maria Alba Sorolla, Silvia Vidal

Cancers. 2022 May; 14(10):2529.

5.3.1. Resum global dels resultats

En els darrers anys, el neutròfil ha guanyat rellevància en el microambient tumoral afavorint el creixement i metàstasi del tumor i la immunosupressió cel·lular. En concret, en pacients amb VPM derivat de càncer de pulmó es considera que un índex neutròfil-limfòcit elevat en el líquid pleural és un indicador de mal pronòstic. Això suggereix que els neutròfils són una potencial diana terapèutica i un possible biomarcador de l'estat del malalt amb càncer. Tot i això, es requereixen més estudis per comprendre els mecanismes efectors del neutròfil en el VPM. En un primer treball presentat pel nostre grup de recerca, vàrem mostrar una associació negativa entre el nombre de neutròfils del VPM i la supervivència dels pacients amb adenocarcinoma pulmonar⁹⁷. A més a més, tot i no observar diferències en el nombre de neutròfils entre els VPMs i els VPBs, aquells pacients que tenien més cèl·lules tumorals en el VPM presentaven també més neutròfils, suggerint la possible relació entre aquests dos tipus cel·lulars⁹⁷.

Aquest treball es va dissenyar amb l'objectiu principal d'estudiar el paper del neutròfil en el VPM. En primer lloc, es va caracteritzar el fenotip dels neutròfils del VPM i analitzar l'efecte VPM sobre les funcions del neutròfil, incloses la NETosi, la desgranulació, l'esclat oxidatiu i l'apoptosi. En segon lloc, es van analitzar l'associació entre les molècules immunomoduladores del VPM i les funcions dels neutròfils. Finalment, es va avaluar la rellevància clínica de l'activitat del neutròfil com a biomarcador de diagnòstic i/o pronòstic pels pacients amb VPM.

L'estudi van incloure 47 pacients amb VPM derivat d'adenocarcinoma pulmonar i, com a grup control, 25 pacients amb IC que havien desenvolupat VPB. Els líquids pleurals es van centrifugar per tal de separar-ne el contingut cel·lular. Un cop lliures de cèl·lules, es van analitzar molecularment i es van fer servir per estudiar-ne l'efecte sobre les funcions del neutròfil. Donat que el neutròfil és una cèl·lula molt sensible i no pot ser congelada-

descongelada, es van aïllar neutròfils de la sang de donants sans i es van cultivar amb líquids pleurals lliures de cèl·lules per estudiar com el VPM modulava la seva resposta.

L'anàlisi de contingut cel·lular dels líquids pleurals va revelar nombres similars de neutròfils en ambdós tipus de VPs. Tot i això, els nivells de IL-8, una quimiocina atraient de neutròfils, eren significativament més elevats en VPMs. Pel que fa al fenotip dels neutròfils, no es van observar canvis en l'expressió de marcadors d'activació (CD15, CD16 i CD66b) entre els VPMs i els VPBs, excepte en la freqüència de neutròfils S100A8/9⁺ que era menor en els VPMs.

Per estudiar l'efecte dels líquids pleurals sobre les funcions dels neutròfils, es va dissenyar un model de cultiu *in vitro* on s'estimulaven neutròfils, aïllats de donants sans, en presència de medi suplementat amb el 25% de VPM o VPB. Els neutròfils sans estimulats en presència de VPMs retardaven l'apoptosi, produïen més NETs i menys ROS en comparació amb els neutròfils sans estimulats en presència de VPBs. Tot i quantificar més DNA extracel·lular en VPMs que en VPBs, no es correlacionava amb la capacitat dels neutròfils de produir NETs, possiblement per l'existència d'altres fonts de DNA, com les cèl·lules inflamatòries o les cèl·lules tumorals que entren en apoptosi^{189,370}. En línia amb la disminució de la capacitat oxidativa observada en els neutròfils estimulats en presència de VPMs, els nivells de nitrat, un tipus de RNS, eren menors en els VPMs en comparació amb els VPBs. La desgranulació es va mesurar de forma indirecta quantificant les molècules representatives de cadascun dels tipus de grànuls en els VPMs i VPBs per mitjà d'ELISAs específics. La concentració de MPO, lactoferrina i MMP-9 eren significativament més elevada en els VPMs que en els VPBs. Per avaluar el potencial diagnòstic d'aquestes molècules es van aplicar les corbes ROC que van mostrar una major especificitat per la MPO (92%) i una major sensibilitat per la IL-8 (93,6%). En els VPMs, la freqüència de cèl·lules tumorals es correlacionava positivament amb la concentració de MMP-9 i negativament amb la de lactoferrina.

Evidències experimentals suggereixen que les plaquetes preconditionades pel tumor poden estimular la formació de NETs per part dels neutròfils associats al tumor³⁷¹. Així doncs, donada la importància de les interaccions entre el neutròfil i la plaqueta en la progressió tumoral, es va analitzar la relació entre els nivells pleurals dels factors derivats de les plaquetes i les funcions dels neutròfils. Aquesta anàlisi va revelar diferents patrons d'associació en funció de l'etiologia del VP. En els pacients amb VPM, la NETosi es correlacionava directament amb els nivells de MMP-9, la P-selectina i PD-L1 soluble del líquid pleural mentre que la viabilitat dels neutròfils es correlacionava directament amb els nivells de MPO. També es va observar una tendència

negativa entre la NETosi i els nivells pleurals de lactoferrina. D'altra banda, en els pacients amb VPB, la NETosi es correlacionava directament amb els nivells de MPO, MMP-9 i PF4.

Des del punt de vista clínic, la supervivència dels pacients amb VPM estava associada positivament amb els nivells pleurals de lactoferrina però negativament amb la NETosi. Fins i tot, a curt termini (6 mesos després del diagnòstic del VPM), valors de NETosi elevats ja predeïen un pitjor pronòstic. D'altra banda, els nivells pleurals de LDH i PCR, indicadors d'inflamació, es relacionaven directament amb els nivells de lactoferrina, MMP-9 i MPO en els VPMs.

5.3.2. Discussió i rellevància

El fet que el VPM contingui cèl·lules tumorals vives o leucòcits en suspensió, el converteix en una model útil per estudiar la resposta immunitària local en el microambient metastàtic. El VPM es drena de forma rutinària oferint així la possibilitat d'obtenir-lo sense cap procediment/cost afegit. Tot i la rellevància que han guanyat els neutròfils en la progressió tumoral, el paper d'aquesta cèl·lula en la metàstasi pleural es trobava poc estudiat. El nostre estudi revela les molècules potencialment implicades en la modulació de l'activitat dels neutròfils en el microambient metastàtic del VPM.

L'etiologia del líquid pleural condiona la resposta dels neutròfils; els VPMs estimulen l'alliberació de productes de desgranulació i NETs en comparació amb els VPBs. La supervivència dels neutròfils també va ser major en els VPMs indicant que segurament hi ha factors en el líquid pleural que allarguen la vida mitjana del neutròfil, possiblement per afavorir la progressió tumoral. La composició molecular i el patró d'associacions entre els factors immunomoduladors dels VPs i les funcions del neutròfil van diferir en funció de l'etiologia del VP. Seria interessant validar els resultats obtinguts analitzant les funcions dels neutròfils frescos aïllats directament del líquid pleural.

Curiosament, els mateixos factors alliberats en la desgranulació podrien estar modulant la capacitat del neutròfil per produir NETs. No és estrany que la MMP-9 s'associés de forma directa amb la NETosi, ja que és un dels components de les NETs^{372,373}. Per altra banda, la tendència negativa observada entre la lactoferrina i la NETosi podria estar suggerint l'acció d'aquesta molècula com a modulador negatiu de l'activitat dels neutròfils. En línia amb aquesta hipòtesi, Okubo i col·laboradors van demostrar prèviament que la lactoferrina inhibia la formació de NETs sense afectar la producció de ROS³⁷⁴. A més a més, els nivells de P-

selectina i PD-L1 soluble es correlacionaven directament amb la NETosi en pacients amb VPM, suggerint el paper de la plaqueta com a modulador de l'activitat del neutròfil en la metàstasi pleural. Estudis previs podrien explicar aquesta relació; d'una banda, la P-selectina preestimula els neutròfils per a què alliberin NETs a través de la unió del PSGL-1³³² i per l'altre, s'ha descrit recentment que les NETs poden contenir PD-L1³⁷⁵.

Clínicament, els resultats d'aquest article revelen que l'activitat del neutròfil pot ser útil com a biomarcador de diagnòstic, ja que els nivells de lactoferrina, MMP-9, MPO i IL-8 permetien diferenciar els VPM derivats de pacients amb adenocarcinoma pulmonar dels VPB derivats de pacients amb IC. Les correlacions trobades entre els productes de desgranulació i els paràmetres bioquímics pleurals (LDH i PCR) deixen entreveure la participació dels neutròfils en la inflamació local associada a la malignitat. A més a més, es tracta del primer estudi on s'associa la NETosi amb un pitjor pronòstic en pacients amb VPM. Aquesta troballa suggereix que les NETs, per si soles, podrien considerar-se potencials dianes terapèutiques. Aquests resultats obren la porta a futurs estudis que explorin en detall els mecanismes moleculars implicats en la formació de les NETs per tal de desenvolupar teràpies dirigides contra aquestes xarxes de DNA. Es coneixen diversos compostos capaços d'inhibir la NETosi com les tetrahidroisoquinolines³⁷⁶ o el propofol (fàrmac sedant/anestèsic)³⁷⁷. Seria interessant estudiar si podrien administrar-se a nivell pleural per inhibir la NETosi i millorar el pronòstic dels pacients amb VPM. Addicionalment, seria convenient comprovar si els resultats obtinguts en VPMs derivats de càncer de pulmó són extrapolables a VPMs derivats d'altres càncers com el de mama o el d'ovari.

6. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. La composició molecular i les associacions entre els factors immunomoduladors dels VPs varien en funció de l'etiologia. El microambient tumoral del VPM de pacients amb adenocarcinoma pulmonar està enriquit en factors derivats de la plaqueta, com són el TGF- β , el PF4, la P-selectina i el VEGF, en comparació amb els VPBs derivats de pacients amb IC. Aquests factors aporten un caràcter immunosupressor al VPM.
2. El PF4 està implicat en la supressió de la resposta dels limfòcits T en el VPM i en la inducció d'un fenotip antiinflamatori, afavorint així la progressió tumoral. Concentracions pleurals elevades d'aquesta molècula es relacionen amb una menor activació, proliferació, i activitat citotòxica dels limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺.
3. L'elevat contingut de PF4 dels VPMs prové parcialment d'una major producció local per part de les cèl·lules del líquid pleural, inclosos els limfòcits T activats, tot i no ser-ne la font principal. Malgrat no detectar un nombre significatiu de plaquetes, no es descarta que la principal via d'entrada puguin ser les PMPs.
4. Tot i que el nombre de neutròfils és similar en VPMs i VPBs, el microambient tumoral del VPM estimula l'activitat protumoral del neutròfil promovent la desgranulació i la NETosi, mentre que frena l'esclat oxidatiu en comparació amb els VPs.
5. La concentració dels productes de desgranulació (MPO, lactoferrina i MMP-9), així com de IL-8, dels VPs permeten distingir els VPMs dels VPBs tal i com es demostra en les corbes ROC. Donada la importància del diagnòstic precoç del VPM, podria considerar-se una mesura complementària per afegir a l'anàlisi del líquid pleural.
6. La NETosi s'associa positivament amb la concentració pleural de P-selectina i PD-L1 soluble en VPMs indicant la participació dels factors derivats de la plaqueta en la modulació de l'activitat del neutròfil.
7. La concentració pleural de PF4 i la capacitat del VPM d'induir la NETosis són útils com a variables independents predictorres de la supervivència dels pacients amb VPM derivat d'adenocarcinoma pulmonar. En ambdós casos, valors elevats s'associen a un mal pronòstic.

7. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Charalampidis, C. *et al.* Pleura space anatomy. *J. Thorac. Dis.* **7**, S27 (2015).
2. Sahn, S. A. The Pleura. *Am. Rev. Respir. Dis.* **138**, 184–234 (1988).
3. Noppen, M. *et al.* Volume and Cellular Content of Normal Pleural Fluid in Humans Examined by Pleural Lavage. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.3.9910050> **162**, 1023–1026 (2012).
4. Baldacci, S. *et al.* Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur. Respir. J.* **20**, 1545–1558 (2002).
5. Antony, V. B. Immunological mechanisms in pleural disease. *Eur. Respir. J.* **21**, 539–544 (2003).
6. Pistolesi, M., Miniati, M. & Giuntini, C. Pleural Liquid and Solute Exchange. *Am. Rev. Respir. Dis.* **140**, 825–847 (1989).
7. Jesús, M. & Martín, C. EMBRIOLOGÍA, ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA PLEURAL. in *Efermedades de la pleura. Neumomadrid* 14 (2003).
8. Noppen, M. Normal volume and cellular contents of pleural fluid. *Paediatr. Respir. Rev.* **5**, S201–S203 (2004).
9. Arora, R. D. & Boster, J. Malignant Pleural Effusion. *StatPearls* (2022).
10. Kinasewitz, G. T. Pleural fluid dynamics and effusions. in *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders*. New York: McGraw-Hill Book Company 1389–1409 (1998).
11. Taghizadeh, N., Fortin, M. & Tremblay, A. US Hospitalizations for Malignant Pleural Effusions: Data From the 2012 National Inpatient Sample. *Chest* **151**, 845–854 (2017).
12. Sahn, S. A. The Pathophysiology of Pleural Effusions. *Annu. Rev. Med.* **41**, 7–13 (1990).
13. Feller-Kopman, D. & Light, R. Pleural Disease. *N. Engl. J. Med.* **378**, 740–751 (2018).
14. Light, R. W., Macgregor, M. I., Luchsinger, P. C. & Ball, W. C. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann. Intern. Med.* **77**, 507–513 (1972).
15. Kinasewitz, G. T. Transudative effusions. *Eur. Respir. J.* **10**, 714–718 (1997).
16. Ferreiro, L., Porcel, J. M. & Valdés, L. Diagnosis and Management of Pleural Transudates. *Arch. Bronconeumol. (English Ed.)* **53**, 629–636 (2017).
17. Na, M. J. Diagnostic tools of pleural effusion. *Tuberc. Respir. Dis. (Seoul)*. **76**, 199–210 (2014).
18. Wiener-Kronish, J. P. *et al.* Relationship of pleural effusions to pulmonary hemodynamics in patients with congestive heart failure. *Am. Rev. Respir. Dis.* **132**, 1253–1256 (1985).
19. Porcel, J. M. & Light, R. W. Diagnostic approach to pleural effusion in adults. *Am. Fam. Physician* **73**, 1211–1220 (2006).

20. Jany, B. & Welte, T. Pleural Effusion in Adults-Etiology, Diagnosis, and Treatment. *Dtsch. Arztebl. Int.* **116**, 377–386 (2019).
21. Karkhanis, V. S. & Joshi, J. M. Pleural effusion: Diagnosis, treatment, and management. *Open Access Emerg. Med.* **4**, 31–52 (2012).
22. Ansari, T. & Idell, S. MANAGEMENT OF UNDIAGNOSED PERSISTENT PLEURAL EFFUSIONS. *Clin. Chest Med.* **19**, 407–417 (1998).
23. Light, R. W. Pleural Effusion. *N. Engl. J. Med.* **346**, 1971–7 (2002).
24. Han, Z. J. *et al.* Diagnostic Accuracy of Natriuretic Peptides for Heart Failure in Patients with Pleural Effusion: A Systematic Review and Updated Meta-Analysis. *PLoS One* **10**, e0134376 (2015).
25. Han, C. H., Choi, J. E. & Chung, J. H. Clinical utility of pleural fluid NT-pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP) in patients with pleural effusions. *Intern. Med.* **47**, 1669–1674 (2008).
26. Dixit, R. *et al.* Diagnosis and management options in malignant pleural effusions. *Lung India* **34**, 160–166 (2017).
27. Sachdeva, A., Shepherd, R. W. & Lee, H. J. Thoracentesis and Thoracic Ultrasound: State of the Art in 2013. *Clin. Chest Med.* **34**, 1–9 (2013).
28. Havelock, T., Teoh, R., Laws, D. & Gleeson, F. Pleural procedures and thoracic ultrasound: British Thoracic Society pleural disease guideline 2010. *Thorax* **65**, i61 LP-i76 (2010).
29. Rodríguez-Panadero, F. & López Mejías, J. Low Glucose and pH Levels in Malignant Pleural Effusions: Diagnostic Significance and Prognostic Value in Respect to Pleurodesis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **139**, 663–667 (1989).
30. Villena Garrido, V. *et al.* Diagnosis and Treatment of Pleural Effusion. *Arch. Bronconeumol.* **42**, 349–372 (2006).
31. Light, R. W., Erozan, Y. S. & Ball Jr., W. C. Cells in Pleural Fluid: Their Value in Differential Diagnosis. *Arch. Intern. Med.* **132**, 854–860 (1973).
32. Hooper, C., Lee, Y. C. G. & Maskell, N. Investigation of a unilateral pleural effusion in adults: British Thoracic Society pleural disease guideline 2010. *Thorax* **65**, ii4–ii17 (2010).
33. Loveland, P., Christie, M., Hammerschlag, G., Irving, L. & Steinfors, D. Diagnostic yield of pleural fluid cytology in malignant effusions: an Australian tertiary centre experience. *Intern. Med. J.* **48**, 1318–1324 (2018).
34. PORCEL, J. M. Pearls and myths in pleural fluid analysis. *Respirology* **16**, 44–52 (2011).
35. Bailey, M. *et al.* Routine Microbiologic Studies of Pleural Fluid Specimens in Cancer Patients. *Am. J. Med.* **133**, 240–244 (2020).
36. Lim, J. H. & Ryu, J. S. Current perspective on the diagnosis of malignant pleural effusion. *J. Thorac. Dis.* **11**, S1234 (2019).
37. Psallidas, I., Kalomenidis, I., Porcel, J. M., Robinson, B. W. & Stathopoulos, G. T.

- Malignant pleural effusion: From bench to bedside. *Eur. Respir. Rev.* **25**, 189–198 (2016).
38. Han, Y.-Q. *et al.* Diagnostic accuracy of cancer ratio for malignant pleural effusion: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Transl. Med.* **7**, 554 (2019).
 39. Panjwani, A. & Zaid, T. An interesting case of undiagnosed pleural effusion. *Breathe* **13**, e46–e52 (2017).
 40. Prina, E., Torres, A. & Carvalho, C. R. R. Lung ultrasound in the evaluation of pleural effusion. *Jornal brasileiro de pneumologia* **40**, 1–5 (2014).
 41. Leung, A. N., Müller, N. L. & Miller, R. R. CT in differential diagnosis of diffuse pleural disease. *Am. J. Roentgenol.* **154**, 487–492 (1990).
 42. Yilmaz, U., Polat, G., Sahin, N., Soy, O. & Gülay, U. CT in differential diagnosis of benign and malignant pleural disease. *Monaldi Arch. chest Dis.* **63**, 17–22 (2005).
 43. Bittner, R. C. & Felix, R. Magnetic resonance (MR) imaging of the chest: state-of-the-art. *Eur. Respir. J.* **11**, 1392–1404 (1998).
 44. Porcel, J. M. Biomarkers in the diagnosis of pleural diseases: a 2018 update. *Ther. Adv. Respir. Dis.* **12**, 1753466618808660 (2018).
 45. Zhang, M., Yan, L., Lippi, G. & Hu, Z. De. Pleural biomarkers in diagnostics of malignant pleural effusion: a narrative review. *Transl. Lung Cancer Res.* **10**, 1557–1570 (2021).
 46. Porcel, J. M., Esquerda, A., Vives, M. & Bielsa, S. Etiology of Pleural Effusions: Analysis of More Than 3,000 Consecutive Thoracenteses. *Arch. Bronconeumol.* **50**, 161–165 (2014).
 47. Davidson, B., Tötsch, M., Wohlschlaeger, J., Hager, T. & Pinamonti, M. The diagnostic role of BAP1 in serous effusions. *Hum. Pathol.* **79**, 122–126 (2018).
 48. Skok, K., Hladnik, G., Grm, A. & Crnjac, A. Malignant Pleural Effusion and Its Current Management: A Review. *Medicina (B. Aires).* **55**, (2019).
 49. Directors ATSBo. Management of Malignant Pleural Effusions. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162**, 1987–2001 (2000).
 50. Light, R. W. Pleural Effusions. *Med. Clin. North Am.* **95**, 1055–1070 (2011).
 51. Rahman, N. M. *et al.* Local anaesthetic thoracoscopy: British Thoracic Society pleural disease guideline 2010. *Thorax* **65**, ii54–ii60 (2010).
 52. Awadallah, S. F., Bowling, M. R., Sharma, N. & Mohan, A. Malignant pleural effusion and cancer of unknown primary site: a review of literature. *Ann. Transl. Med.* **7**, 353 (2019).
 53. Zappa, C. & Mousa, S. A. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl. lung cancer Res.* **5**, 288–300 (2016).
 54. Porcel, J. M. Malignant pleural effusions because of lung cancer. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **22**, 356–361 (2016).
 55. Antony, V. B. *et al.* Management of malignant pleural effusions. *Eur. Respir. J.* **18**, 402–419 (2001).

56. Tang, Y. *et al.* High-throughput screening of rare metabolically active tumor cells in pleural effusion and peripheral blood of lung cancer patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 2544–2549 (2017).
57. Halimi, M., BeheshtiRouy, S., Salehi, D. & Rasihashemi, S. Z. The Role of Immunohistochemistry Studies in Distinguishing Malignant Mesothelioma from Metastatic Lung Carcinoma in Malignant Pleural Effusion. *Iran. J. Pathol.* **14**, 122–126 (2019).
58. Dinu, M., Ciurea, R. N., Stefan, M. & Georgescu, A. C. The role of immunohistochemistry in the diagnosis of neoplastic pleural effusions. *Rom. J. Morphol. Embryol. = Rev. Roum. Morphol. Embryol.* **53**, 817–820 (2012).
59. Ceyhan, B. B., Demiralp, E. & Çelikel, T. Analysis of Pleural Effusions Using Flow Cytometry. *Respiration* **63**, 17–24 (1996).
60. Lumachi, F., Ubiali, P., Tozzoli, R., Sulfaro, S. C. & Basso, S. M. Flow cytometry immunophenotyping of pleural fluid cytology in patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and malignant pleural effusion. *Ann. Oncol.* **28**, ii11 (2017).
61. Wong-Arteta, J., Rey, M., Aragón, L., Gil-Rodríguez, E. & Bujanda, L. The utility of flow cytometry in the diagnostic work up of malignant effusions due to nonhematopoietic neoplasms. *Cytom. Part B Clin. Cytom.* **98**, 504–515 (2020).
62. Roberts, M. E., Neville, E., Berrisford, R. G., Antunes, G. & Ali, N. J. Management of a malignant pleural effusion: British Thoracic Society pleural disease guideline 2010. *Thorax* **65**, ii32–ii40 (2010).
63. Peng, P., Yang, Y., Du, J., Zhai, K. & Shi, H.-Z. Prognostic biomarkers of malignant patients with pleural effusion: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Cell Int.* **22**, 99 (2022).
64. Clive, A. O. *et al.* Predicting survival in malignant pleural effusion: development and validation of the LENT prognostic score. *Thorax* **69**, 1098–1104 (2014).
65. Raimundo, S., Loureiro, A. I., Vieira, F. & Fernandes, A. LENT Score: Predicting the Survival of Malignant Pleural Effusion – A Prospective Study of Three Years. *Arch. Bronconeumol. (English Ed.)* **56**, 465–466 (2020).
66. Abisheganaden, J., Verma, A., Dagaonkar, R. S. & Light, R. W. An Observational Study Evaluating the Performance of LENT Score in the Selected Population of Malignant Pleural Effusion from Lung Adenocarcinoma in Singapore. *Respiration* **96**, 308–313 (2018).
67. Psallidas, I. *et al.* Development and validation of response markers to predict survival and pleurodesis success in patients with malignant pleural effusion (PROMISE): a multicohort analysis. *Lancet. Oncol.* **19**, 930–939 (2018).
68. Dipper, A. & Maskell, N. Prognostication in malignant pleural effusion: One size does not fit all. *Respirology* **25**, 1229–1230 (2020).
69. Quek, J. C., Tan, Q. L., Allen, J. C. & Anantham, D. Malignant pleural effusion survival prognostication in an Asian population. *Respirology* **25**, 1283–1291 (2020).
70. Houston, M. C. Pleural fluid pH: Diagnostic, therapeutic, and prognostic value. *Am. J.*

- Surg.* **154**, 333–337 (1987).
71. Hirayama, N. *et al.* Pleural effusion VEGF levels as a prognostic factor of malignant pleural mesothelioma. *Respir. Med.* **105**, 137–142 (2011).
 72. Demirag, F., Ünsal, E., Yilmaz, A. & çağlar, A. Prognostic Significance of Vascular Endothelial Growth Factor, Tumor Necrosis, and Mitotic Activity Index in Malignant Pleural Mesothelioma. *Chest* **128**, 3382–3387 (2005).
 73. Xu, Y., Xu, C., Zhao, F., Chen, G. & Sun, W. Diagnostic and Prognostic Value of Survivin in Pleural Effusion. *Adv. Lung Cancer* **7**, 9 (2018).
 74. Xu, C., Yu, L., Zhan, P. & Zhang, Y. Elevated pleural effusion IL-17 is a diagnostic marker and outcome predictor in lung cancer patients. *Eur. J. Med. Res.* **19**, 23 (2014).
 75. Mu, C.-Y., Qin, P.-X., Qu, Q.-X., Chen, C. & Huang, J.-A. Soluble CD40 in plasma and malignant pleural effusion with non-small cell lung cancer: A potential marker of prognosis. *Chronic Dis. Transl. Med.* **1**, 36–41 (2015).
 76. Feller-Kopman, D. J. *et al.* Management of Malignant Pleural Effusions. An Official ATS/STS/STR Clinical Practice Guideline. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **198**, 839–849 (2018).
 77. Huggins, J. T., Doelken, P. & Sahn, S. A. The unexpandable lung. *F1000 Med. Rep.* **2**, 77 (2010).
 78. Murthy, P. *et al.* Making cold malignant pleural effusions hot: driving novel immunotherapies. *Oncoimmunology* **8**, e1554969 (2019).
 79. Clive, A. O., Jones, H. E., Bhatnagar, R., Preston, N. J. & Maskell, N. Interventions for the management of malignant pleural effusions: a network meta-analysis. *Cochrane database Syst. Rev.* **2016**, CD010529 (2016).
 80. Montes-Worboys, A., Rodriguez-Portal, J. A., Arellano-Orden, E., Digón-Pereiras, J. & Rodriguez-Panadero, F. Interleukin-8 activates coagulation and correlates with survival after talc pleurodesis. *Eur. Respir. J.* **35**, 160–166 (2010).
 81. Fysh, E. T. H. *et al.* Protocol of the Australasian Malignant Pleural Effusion (AMPLE) trial: a multicentre randomised study comparing indwelling pleural catheter versus talc pleurodesis. *BMJ Open* **4**, e006757 (2014).
 82. Bhatnagar, R. *et al.* Outpatient Talc Administration by Indwelling Pleural Catheter for Malignant Effusion. *N. Engl. J. Med.* **378**, 1313–1322 (2018).
 83. Coile, C. E., Harvey, J. G. & Senitko, M. Recent Developments in the Management of Malignant Pleural Effusions: a Narrative Review. *Curr. Pulmonol. Reports* **9**, 164–170 (2020).
 84. Lin, J.-B. *et al.* Sequential treatment strategy for malignant pleural effusion in non-small cell lung cancer with the activated epithelial growth factor receptor mutation. *J. Drug Target.* **25**, 119–124 (2017).
 85. Stathopoulos, G. T. & Kalomenidis, I. Malignant pleural effusion: tumor-host interactions unleashed. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186**, 487–492 (2012).
 86. Rodriguez-Panadero, F., Borderas Naranjo, F. & Lopez Mejias, J. Pleural metastatic

- tumours and effusions. Frequency and pathogenic mechanisms in a post-mortem series. *Eur. Respir. J.* **2**, 366–369 (1989).
87. Meyer, P. C. Metastatic carcinoma of the pleura. *Thorax* **21**, 437–443 (1966).
 88. Asciak, R. *et al.* Pleural Fluid Has Pro-Growth Biological Properties Which Enable Cancer Cell Proliferation. *Front. Oncol.* **11**, 1022 (2021).
 89. Zhang, X., Nie, D. & Chakrabarty, S. Growth factors in tumor microenvironment. *Front. Biosci.* **15**, 151–165 (2010).
 90. Quail, D. F. & Joyce, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **19**, 1423–1437 (2013).
 91. Light, R. W. & Hamm, H. Malignant pleural effusion: would the real cause please stand up? *Eur. Respir. J.* **10**, 1701–1702 (1997).
 92. Batra, H. & Antony, V. B. Pleural mesothelial cells in pleural and lung diseases. *J. Thorac. Dis.* **7**, 964–980 (2015).
 93. Nasreen, N. *et al.* Polar production of interleukin-8 by mesothelial cells promotes the transmesothelial migration of neutrophils: Role of intercellular adhesion molecule-1. *J. Infect. Dis.* **183**, 1638–1645 (2001).
 94. Kroegel, C. & Antony, V. B. Immunobiology of pleural inflammation: potential implications for pathogenesis, diagnosis and therapy. *Eur. Respir. J.* **10**, 2411–2418 (1997).
 95. Qin, X. J. *et al.* CCL22 recruits CD4-positive CD25-positive regulatory T cells into malignant pleural effusion. *Clin. Cancer Res.* **15**, 2231–2237 (2009).
 96. Martinenaite, E. *et al.* CCL22-specific T Cells: Modulating the immunosuppressive tumor microenvironment. *Oncoimmunology* **5**, e1238541 (2016).
 97. Nieto, J. C. *et al.* Migrated T lymphocytes into malignant pleural effusions: an indicator of good prognosis in lung adenocarcinoma patients. *Sci. Rep.* **9**, 2996 (2019).
 98. Ardighieri, L. *et al.* Infiltration by CXCL10 Secreting Macrophages Is Associated With Antitumor Immunity and Response to Therapy in Ovarian Cancer Subtypes. *Front. Immunol.* **12**, 690201 (2021).
 99. Reschke, R. *et al.* Immune cell and tumor cell-derived CXCL10 is indicative of immunotherapy response in metastatic melanoma. *J. Immunother. Cancer* **9**, (2021).
 100. Antony, V. B. *et al.* Recruitment of inflammatory cells to the pleural space. Chemotactic cytokines, IL-8, and monocyte chemotactic peptide-1 in human pleural fluids. *J. Immunol.* **151**, 7216–7223 (1993).
 101. Pace, E. *et al.* LTB4 is present in exudative pleural effusions and contributes actively to neutrophil recruitment in the inflamed pleural space. *Clin. Exp. Immunol.* **135**, 519–527 (2004).
 102. Liu, G. N. *et al.* Epithelial neutrophil-activating peptide-78 recruits neutrophils into pleural effusion. *Eur. Respir. J.* **34**, 184–190 (2009).
 103. Mutti, L., Piacenza, A., Valenti, V., Castagneto, B. & Betta, P. G. Expression of

- intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) by reactive mesothelial cells in pleural effusions. *Pathologica* **85**, 725–728 (1993).
104. Stathopoulos, G. T. *et al.* Host-derived interleukin-5 promotes adenocarcinoma-induced malignant pleural effusion. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**, 1273–1281 (2010).
 105. Giannou, A. D. *et al.* Mast cells mediate malignant pleural effusion formation. *J. Clin. Invest.* **125**, 2317–2334 (2015).
 106. Huong, P. T., Nguyen, L. T., Nguyen, X.-B., Lee, S. K. & Bach, D.-H. The Role of Platelets in the Tumor-Microenvironment and the Drug Resistance of Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. **11**, 240 (2019).
 107. Baghban, R. *et al.* Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun. Signal.* **2020** *181* **18**, 59 (2020).
 108. Ali, R. A., Wuescher, L. M. & Worth, R. G. Platelets: essential components of the immune system. *Curr. Trends Immunol.* **16**, 65–78 (2015).
 109. Merle, N. S., Church, S. E., Fremeaux-Bacchi, V. & Roumenina, L. T. Complement System Part I – Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front. Immunol.* **6**, 262 (2015).
 110. Borger, J. Gt. I. of I. L. C. and U. T. C. in C. I. L. D., Lau, M. & Hibbs, M. L. The Influence of Innate Lymphoid Cells and Unconventional T Cells in Chronic Inflammatory Lung Disease. *Front. Immunol.* **10**, 1597. (2019).
 111. Eberl, G., Colonna, M., Santo, J. P. Di & McKenzie, A. N. J. Innate lymphoid cells: A new paradigm in immunology. *Science (80-.)*. **348**, aaa6566 (2015).
 112. Marcus, A. *et al.* Chapter Three - Recognition of Tumors by the Innate Immune System and Natural Killer Cells. in *Advances in Immunology* (ed. Alt, F. W.) **122**, 91–128 (Academic Press, 2014).
 113. Lebegge, E. *et al.* Innate Immune Defense Mechanisms by Myeloid Cells That Hamper Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **11**, 1395 (2020).
 114. Gaudino, S. J. & Kumar, P. Cross-Talk Between Antigen Presenting Cells and T Cells Impacts Intestinal Homeostasis, Bacterial Infections, and Tumorigenesis. *Front. Immunol.* **10**, 360 (2019).
 115. Prager, I. & Watzl, C. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *J. Leukoc. Biol.* **105**, 1319–1329 (2019).
 116. Bosi, A. *et al.* Natural killer cells from malignant pleural effusion are endowed with a decidual-like proangiogenic polarization. *J. Immunol. Res.* **2018**, 2438598 (2018).
 117. Kabelitz, D., Serrano, R., Kouakanou, L., Peters, C. & Kalyan, S. Cancer immunotherapy with $\gamma\delta$ T cells: many paths ahead of us. *Cell. Mol. Immunol.* **17**, 925–939 (2020).
 118. Tran Janco, J. M., Lamichhane, P., Karyampudi, L. & Knutson, K. L. Tumor-Infiltrating Dendritic Cells in Cancer Pathogenesis. *J. Immunol.* **194**, 2985 LP – 2991 (2015).
 119. Wang, Z. *et al.* Innate Immune Cells: A Potential and Promising Cell Population for Treating Osteosarcoma. *Front. Immunol.* **10**, 1114 (2019).

120. Ginefra, P., Lorusso, G. & Vannini, N. Innate Immune Cells and Their Contribution to T-Cell-Based Immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 4441 (2020).
121. DeVito, N. C., Plebanek, M. P., Theivanthiran, B. & Hanks, B. A. Role of Tumor-Mediated Dendritic Cell Tolerization in Immune Evasion. *Front. Immunol.* **10**, 2876 (2019).
122. Spel, L., Boelens, J.-J., Nierkens, S. & Boes, M. Antitumor immune responses mediated by dendritic cells. *Oncoimmunology* **2**, e26403 (2013).
123. Yuan, X., Rasul, F., Nashan, B. & Sun, C. Innate lymphoid cells and cancer: Role in tumor progression and inhibition. *Eur. J. Immunol.* **51**, 2188–2205 (2021).
124. Ziegler-Heitbrock, L. Blood monocytes and their subsets: Established features and open questions. *Front. Immunol.* **6**, 423 (2015).
125. Italiani, P. & Boraschi, D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Front. Immunol.* **5**, 514 (2014).
126. Ziegler-Heitbrock, L. & Hofer, T. Toward a Refined Definition of Monocyte Subsets. *Front. Immunol.* **4**, 23 (2013).
127. Brugger, W., Kreuz, M. & Andreesen, R. Macrophage colony-stimulating factor is required for human monocyte survival and acts as a cofactor for their terminal differentiation to macrophages in vitro. *J. Leukoc. Biol.* **49**, 483–488 (1991).
128. Olingy, C. E., Dinh, H. Q. & Hedrick, C. C. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J. Leukoc. Biol.* **106**, 309–322 (2019).
129. Luo, L. *et al.* Non-classical monocytes potentiates the pathogenesis of malignant pleural effusion via the production of IL-1 β . *Eur. Respir. J.* **54**, PA3664 (2019).
130. Luo, L. *et al.* Monocytes subtypes from pleural effusion reveal biomarker candidates for the diagnosis of tuberculosis and malignancy. *J. Clin. Lab. Anal.* **36**, e24579 (2022).
131. Jayasingam, S. D. *et al.* Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice. *Front. Oncol.* **9**, 1512 (2020).
132. Yao, Y., Xu, X.-H. & Jin, L. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Front. Immunol.* **10**, 792 (2019).
133. Zhou, J. *et al.* Tumor-Associated Macrophages: Recent Insights and Therapies. *Front. Oncol.* **10**, 188 (2020).
134. Blumenthal, R. L. *et al.* Human alveolar macrophages induce functional inactivation in antigen-specific CD4 T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **107**, 258–264 (2001).
135. Evren, E. *et al.* Distinct developmental pathways from blood monocytes generate human lung macrophage diversity. *Immunity* **54**, 259–275.e7 (2021).
136. Kaczmarek, M. & Sikora, J. Macrophages in malignant pleural effusions - Alternatively activated tumor associated macrophages. *Wspolczesna Onkol.* **16**, 279–284 (2012).
137. Li, L. *et al.* Impaired T cell function in malignant pleural effusion is caused by TGF- β derived predominantly from macrophages. *Int. J. Cancer* **139**, 2261–2269 (2016).

138. Noy, R. & Pollard, J. W. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity* **41**, 49–61 (2014).
139. Wu, M. F. *et al.* The M1/M2 spectrum and plasticity of malignant pleural effusion-macrophage in advanced lung cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **70**, 1435–1450 (2021).
140. Frankenberger, M. *et al.* Immunologic characterization of normal human pleural macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **23**, 419–26 (2000).
141. Huang, Z. Y. *et al.* Single-cell analysis of diverse immune phenotypes in malignant pleural effusion. *Nat. Commun.* **2021 121** **12**, 1–12 (2021).
142. Pei, X. Bin, Wu, X. Z., Yi, F. S., Zhai, K. & Shi, H. Z. Diagnostic value of CD206 + CD14 + macrophages in diagnosis of lung cancer originated malignant pleural effusion. *J. Thorac. Dis.* **11**, 2730–2736 (2019).
143. Yang, L. *et al.* CD163+ tumor-associated macrophage is a prognostic biomarker and is associated with therapeutic effect on malignant pleural effusion of lung cancer patients. *Oncotarget* **6**, 10592–603 (2015).
144. Brostjan, C. & Oehler, R. The role of neutrophil death in chronic inflammation and cancer. *Cell Death Discov.* **2020 61** **6**, 1–8 (2020).
145. Voisin, M.-B. & Nourshargh, S. Neutrophil Transmigration: Emergence of an Adhesive Cascade within Venular Walls. *J. Innate Immun.* **5**, 336–347 (2013).
146. Grieshaber-Bouyer, R. & Nigrovic, P. A. Neutrophil heterogeneity as therapeutic opportunity in immune-mediated disease. *Front. Immunol.* **10**, 346 (2019).
147. Lacy, P. Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* **2**, 1–11 (2006).
148. Mollinedo, F. Neutrophil Degranulation, Plasticity, and Cancer Metastasis. *Trends Immunol.* **40**, 228–242 (2019).
149. Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D. & Zychlinsky, A. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. <https://doi-org.sire.ub.edu/10.1146/annurev-immunol-020711-074942> **30**, 459–489 (2012).
150. Uribe-Querol, E. & Rosales, C. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Front. Immunol.* **11**, 1066 (2020).
151. Lee, W. L., Harrison, R. E. & Grinstein, S. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect.* **5**, 1299–1306 (2003).
152. Nguyen, G. T., Green, E. R. & Meccas, J. Neutrophils to the ROScues: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 373 (2017).
153. Dahlgren, C., Karlsson, A. & Bylund, J. Intracellular Neutrophil Oxidants: From Laboratory Curiosity to Clinical Reality. *J. Immunol.* **202**, 3127–3134 (2019).
154. Fialkow, L., Wang, Y. & Downey, G. P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 153–164 (2007).

155. Navegantes, K. C. *et al.* Immune modulation of some autoimmune diseases: the critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity. *J. Transl. Med.* **15**, 36 (2017).
156. Mayadas, T. N., Cullere, X. & Lowell, C. A. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu. Rev. Pathol.* **9**, 181 (2014).
157. Jorch, S. K. & Kubes, P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat. Med.* **23**, 279–287 (2017).
158. Khan, U. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps in Colorectal Cancer Progression and Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 7260 (2021).
159. Tamassia, N. *et al.* Cytokine production by human neutrophils: Revisiting the “dark side of the moon”. *Eur. J. Clin. Invest.* **48**, e12952 (2018).
160. Ocana, A., Nieto-Jiménez, C., Pandiella, A. & Templeton, A. J. Neutrophils in cancer: prognostic role and therapeutic strategies. *Mol. Cancer* **16**, (2017).
161. Furumaya, C., Martinez-Sanz, P., Bouti, P., Kuijpers, T. W. & Matlung, H. L. Plasticity in Pro- and Anti-tumor Activity of Neutrophils: Shifting the Balance. *Front. Immunol.* **11**, 2100 (2020).
162. Uribe-Querol, E. & Rosales, C. Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin. *J. Immunol. Res.* **2015**, 983698 (2015).
163. Masucci, M. T., Minopoli, M., Del Vecchio, S. & Carriero, M. V. The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Tumor Progression and Metastasis. *Front. Immunol.* **11**, 1749 (2020).
164. Masucci, M. T., Minopoli, M. & Carriero, M. V. Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy. *Front. Oncol.* **9**, 1146 (2019).
165. Hedrick, C. C. & Malanchi, I. Neutrophils in cancer: heterogeneous and multifaceted. *Nat. Rev. Immunol.* **2021** 223 **22**, 173–187 (2021).
166. Cutone, A. *et al.* Lactoferrin’s anti-cancer properties: Safety, selectivity, and wide range of action. *Biomolecules* **10**, 456 (2020).
167. Koga, Y., Matsuzaki, A., Suminoe, A., Hattori, H. & Hara, T. Neutrophil-derived TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a novel mechanism of antitumor effect by neutrophils. *Cancer Res.* **64**, 1037–1043 (2004).
168. Ma, J., Li, N., Lin, Y., Gupta, C. & Jiang, F. Circulating Neutrophil MicroRNAs as Biomarkers for the Detection of Lung Cancer. *Biomark. Cancer* **8**, 1–7 (2016).
169. Lee, Y. S. *et al.* Prognostic impact of a new score using neutrophil-to-lymphocyte ratios in the serum and malignant pleural effusion in lung cancer patients. *BMC Cancer* **17**, 557 (2017).
170. Popowicz, N. *et al.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio in malignant pleural fluid: Prognostic significance. *PLoS One* **16**, e0250628 (2021).
171. Kotyza, J., Havel, D., Vrzalová, J., Kulda, V. & Pesek, M. Diagnostic and prognostic significance of inflammatory markers in lung cancer-associated pleural effusions. *Int. J. Biol. Markers* **25**, 12–20 (2010).

172. Tang, T. *et al.* A role for Mac-1 (CD11b/CD18) in immune complex-stimulated neutrophil function in vivo: Mac-1 deficiency abrogates sustained Fc γ receptor-dependent neutrophil adhesion and complement-dependent proteinuria in acute glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* **186**, 1853–1863 (1997).
173. Segura, R. M. *et al.* Interleukin-8 and markers of neutrophil degranulation in pleural effusions. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**, 1565–1572 (1998).
174. Park, K. J. *et al.* Expression of matrix metalloproteinase-9 in pleural effusions of tuberculosis and lung cancer. *Respiration* **72**, 166–75 (2005).
175. Yun, S. H., Sim, E. H., Goh, R. Y., Park, J. I. & Han, J. Y. Platelet activation: The mechanisms and potential biomarkers. *Biomed Res. Int.* **2016**, 9060143 (2016).
176. Melchinger, H., Jain, K., Tyagi, T. & Hwa, J. Role of Platelet Mitochondria: Life in a Nucleus-Free Zone. *Front. Cardiovasc. Med.* **6**, 153 (2019).
177. Hoffmeister, K. M. *et al.* The Clearance Mechanism of Chilled Blood Platelets. *Cell* **112**, 87–97 (2003).
178. Chen, Y., Zhong, H., Zhao, Y., Luo, X. & Gao, W. Role of platelet biomarkers in inflammatory response. *Biomark. Res.* **8**, 28 (2020).
179. Banerjee, M. & Whiteheart, S. W. The ins and outs of endocytic trafficking in platelet functions. *Curr. Opin. Hematol.* **24**, 467–474 (2017).
180. Fitch-Tewfik, J. L. & Flaumenhaft, R. Platelet granule exocytosis: A comparison with chromaffin cells. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **4**, 77 (2013).
181. Offermanns, S. Activation of Platelet Function Through G Protein-Coupled Receptors. *Circ. Res.* **99**, 1293–1304 (2006).
182. Estevez, B. & Du, X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology* **32**, 162–177 (2017).
183. Zucoloto, A. Z. & Jenne, C. N. Platelet-Neutrophil Interplay: Insights Into Neutrophil Extracellular Trap (NET)-Driven Coagulation in Infection. *Front. Cardiovasc. Med.* **6**, 85 (2019).
184. Pignatelli, P. *et al.* Tumor necrosis factor- α as trigger of platelet activation in patients with heart failure. *Blood* **106**, 1992–1994 (2005).
185. Hally, K., Fauteux-Daniel, S., Hamzeh-Cognasse, H., Larsen, P. & Cognasse, F. Revisiting Platelets and Toll-Like Receptors (TLRs): At the Interface of Vascular Immunity and Thrombosis. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6150 (2020).
186. Habets, K. L. L. *et al.* Anti-citrullinated protein antibodies contribute to platelet activation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 209 (2015).
187. Barbati, C. *et al.* Anti-D4GDI antibodies activate platelets in vitro: a possible link with thrombocytopenia in primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Res. Ther.* **21**, 161 (2019).
188. Ohuchi, M., Inoue, S., Ozaki, Y. & Ueda, K. Platelet count and mean platelet volume are associated with not only bone, soft tissue, and lymph node metastases but also with malignant pleural effusion in lung cancer patients. *Neoplasma* **64**, 140–147 (2017).

189. Palacios-Acedo, A. L. *et al.* Platelets, Thrombo-Inflammation, and Cancer: Collaborating With the Enemy. *Front. Immunol.* **10**, 1805 (2019).
190. Lomnytska, M. *et al.* Platelet protein biomarker panel for ovarian cancer diagnosis. *Biomark. Res.* **6**, 2 (2018).
191. Sabrkhany, S. *et al.* Exploration of the platelet proteome in patients with early-stage cancer. *J. Proteomics* **177**, 65–74 (2018).
192. Xie, B. *et al.* Clinical values of platelet parameters in small cell lung carcinoma with pleural effusion. *Clin. Lab.* **67**, 2298–2305 (2021).
193. Ai, L., Li, J., Ye, T., Wang, W. & Li, Y. Use of Platelet Parameters in the Differential Diagnosis of Lung Adenocarcinoma-Associated Malignant Pleural Effusion and Tuberculous Pleural Effusion. *Dis. Markers* **2022**, 5653033 (2022).
194. Cheng, D. S. *et al.* Vascular endothelial growth factor level correlates with transforming growth factor- β isoform levels in pleural effusions. *Chest* **118**, 1747–1753 (2000).
195. Roca, E. *et al.* Detection of EpCAM-positive microparticles in pleural fluid: A new approach to mini-invasively identify patients with malignant pleural effusions. *Oncotarget* **7**, 3357–3366 (2016).
196. Bonilla, F. A. & Oettgen, H. C. Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S33–S40 (2010).
197. Pancer, Z. & Cooper, M. D. The evolution of adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 497–518 (2006).
198. Vivier, E. & Malissen, B. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nat. Immunol.* **6**, 17–21 (2005).
199. de Charette, M., Marabelle, A. & Houot, R. Turning tumour cells into antigen presenting cells: The next step to improve cancer immunotherapy? *Eur. J. Cancer* **68**, 134–147 (2016).
200. Spurrell, E. L. & Lockley, M. Adaptive immunity in cancer immunology and therapeutics. *Ecancermedicalscience* **8**, 441 (2014).
201. Ribas, A. Adaptive Immune Resistance: How Cancer Protects from Immune Attack. *Cancer Discov.* **5**, 915–919 (2015).
202. Martínez-Lostao, L., Anel, A. & Pardo, J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clin. Cancer Res.* **21**, 5047–5056 (2015).
203. Chen, L. & Flies, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 227–242 (2013).
204. Schnell, A., Bod, L., Madi, A. & Kuchroo, V. K. The yin and yang of co-inhibitory receptors: toward anti-tumor immunity without autoimmunity. *Cell Res.* **30**, 285–299 (2020).
205. Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D. & Xia, B. CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 925135 (2012).
206. Chen, J. *et al.* T Helper 9 Cells: A New Player in Immune-Related Diseases. *DNA Cell Biol.*

- 38**, 1040–1047 (2019).
207. Mirshafiey, A., Simhag, A., El Rouby, N. M. M. & Azizi, G. T-helper 22 cells as a new player in chronic inflammatory skin disorders. *Int. J. Dermatol.* **54**, 880–888 (2015).
 208. Ruterbusch, M., Pruner, K. B., Shehata, L. & Pepper, M. In Vivo CD4+ T Cell Differentiation and Function: Revisiting the Th1/Th2 Paradigm. *Annu. Rev. Immunol.* **38**, 705–725 (2020).
 209. Okeke, E. B. & Uzonna, J. E. The Pivotal Role of Regulatory T Cells in the Regulation of Innate Immune Cells. *Front. Immunol.* **10**, 680 (2019).
 210. Vignali, D. A. A., Collison, L. W. & Workman, C. J. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* **2008** *8*, 523–532 (2008).
 211. Schmidt, A., Oberle, N. & Krammer, P. H. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front. Immunol.* **3**, 51 (2012).
 212. Chávez-Galán, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chávez, R. & Lascurain, R. Cell Death Mechanisms Induced by Cytotoxic Lymphocytes. *Cell. Mol. Immunol.* **2009** *61* **6**, 15–25 (2009).
 213. Tsukumo, S. & Yasutomo, K. Regulation of CD8+ T Cells and Antitumor Immunity by Notch Signaling. *Front. Immunol.* **9**, 101 (2018).
 214. Jorgovanovic, D., Song, M., Wang, L. & Zhang, Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomark. Res.* **8**, 49 (2020).
 215. Takeuchi, A. & Saito, T. CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4+ T Cells, Their Differentiation and Function. *Front. Immunol.* **8**, 194 (2017).
 216. Principe, N. *et al.* Malignant Pleural Effusions—A Window Into Local Anti-Tumor T Cell Immunity? *Front. Oncol.* **11**, 1422 (2021).
 217. Zeng, Y., Wang, L., Zhou, H. & Qi, Y. A meta-analysis of Th1 and Th2 cytokine profiles differentiating tuberculous from malignant pleural effusion. *Sci. Rep.* **12**, 2743 (2022).
 218. Niu, Y. & Zhou, Q. Th17 cells and their related cytokines: vital players in progression of malignant pleural effusion. *Cell. Mol. Life Sci.* **79**, 194 (2022).
 219. Budna, J. *et al.* Regulatory T cells in malignant pleural effusions subsequent to lung carcinoma and their impact on the course of the disease. *Immunobiology* **222**, 499–505 (2017).
 220. Yang, G. *et al.* Treg/Th17 imbalance in malignant pleural effusion partially predicts poor prognosis. *Oncol. Rep.* **33**, 478–84 (2015).
 221. Chee, J. *et al.* Tumour associated lymphocytes in the pleural effusions of patients with mesothelioma express high levels of inhibitory receptors. *BMC Res. Notes* **11**, 1–6 (2018).
 222. LaRosa, D. F. & Orange, J. S. 1. Lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, S364–S369 (2008).
 223. LeBien, T. W. & Tedder, T. F. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* **112**, 1570–1580 (2008).

224. Rolink, A. G., Schaniel, C., Andersson, J. & Melchers, F. Selection events operating at various stages in B cell development. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 202–207 (2001).
225. Loder, F. *et al.* B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J. Exp. Med.* **190**, 75–89 (1999).
226. Gardell, J. L. & Parker, D. C. CD40L is transferred to antigen-presenting B cells during delivery of T-cell help. *Eur. J. Immunol.* **47**, 41–50 (2017).
227. Rosser, E. C. & Mauri, C. Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity* **42**, 607–612 (2015).
228. Schwartz, M., Zhang, Y. & Rosenblatt, J. D. B cell regulation of the anti-tumor response and role in carcinogenesis. *J. Immunother. Cancer* **4**, 40 (2016).
229. Tsou, P., Katayama, H., Ostrin, E. J. & Hanash, S. M. The Emerging Role of B Cells in Tumor Immunity. *Cancer Res.* **76**, 5597–5601 (2016).
230. Kinker, G. S. *et al.* B Cell Orchestration of Anti-tumor Immune Responses: A Matter of Cell Localization and Communication. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 678127 (2021).
231. Lohr, M. *et al.* The prognostic relevance of tumour-infiltrating plasma cells and immunoglobulin kappa C indicates an important role of the humoral immune response in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* **333**, 222–228 (2013).
232. Wu, X. Z. *et al.* Activated naïve B cells promote development of malignant pleural effusion by differential regulation of TH1 and TH17 response. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **315**, L443–L455 (2018).
233. Telvi, L. *et al.* Study of immunoglobulins in pleura and pleural effusions. *Thorax* **34**, 389–392 (1979).
234. Atzeni, F. & Sarzi-Puttini, P. Tumor Necrosis Factor. in *Brenner's Encyclopedia of Genetics (second edition)* (eds. Maloy, S. & Hughes, K. B. T.-B. E. of G. (Second E.)) 229–231 (Academic Press, 2013). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01594-1>
235. Ranta, V. *et al.* Human vascular endothelial cells produce tumor necrosis factor-alpha in response to proinflammatory cytokine stimulation. *Crit. Care Med.* **27**, 2184–2187 (1999).
236. Salomon, B. L. *et al.* Tumor Necrosis Factor α and Regulatory T Cells in Oncoimmunology. *Front. Immunol.* **9**, 444 (2018).
237. Haider, S. & Knöfler, M. Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium. *Placenta* **30**, 111–123 (2009).
238. Aggarwal, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 745–756 (2003).
239. Wang, X. & Lin, Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacol. Sin.* **29**, 1275–1288 (2008).
240. Sheng, Y., Li, F. & Qin, Z. TNF Receptor 2 Makes Tumor Necrosis Factor a Friend of Tumors. *Front. Immunol.* **9**, 1170 (2018).

241. Szlosarek, P. W. *et al.* Expression and regulation of tumor necrosis factor alpha in normal and malignant ovarian epithelium. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 382–390 (2006).
242. Ferrajoli, A. *et al.* The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **100**, 1215–1219 (2002).
243. Stathopoulos, G. T. *et al.* Tumor Necrosis Factor- α Promotes Malignant Pleural Effusion. *Cancer Res.* **67**, 9825–9834 (2007).
244. Stathopoulos, G. T. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha promotes malignant pleural effusion. *Cancer Res.* **67**, 9825–9834 (2007).
245. Odeh, M., Sabo, E., Srugo, I. & Oliven, A. Tumour necrosis factor alpha in the diagnostic assessment of pleural effusion. *QJM An Int. J. Med.* **93**, 819–824 (2000).
246. Aggarwal, A. N. *et al.* Pleural fluid tumor necrosis factor for diagnosis of pleural tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine* **141**, 155467 (2021).
247. Lee, A. J. & Ashkar, A. A. The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. *Front. Immunol.* **9**, 2061 (2018).
248. Bhat, P., Leggatt, G., Waterhouse, N. & Frazer, I. H. Interferon- γ derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell Death Dis.* **8**, e2836 (2017).
249. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* **6**, 13 (2014).
250. Zaidi, M. R. The Interferon-Gamma Paradox in Cancer. *J. Interf. Cytokine Res.* **39**, 30–38 (2019).
251. Castro, F., Cardoso, A. P., Gonçalves, R. M., Serre, K. & Oliveira, M. J. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Front. Immunol.* **9**, 847 (2018).
252. Wongtim, S. *et al.* Interferon gamma for diagnosing tuberculous pleural effusions. *Thorax* **54**, 921–924 (1999).
253. Qazi, B. S., Tang, K. & Qazi, A. Recent Advances in Underlying Pathologies Provide Insight into Interleukin-8 Expression-Mediated Inflammation and Angiogenesis. *Int. J. Inflam.* **2011**, 908468 (2011).
254. Gupta, A. K., Giaglis, S., Hasler, P. & Hahn, S. Efficient Neutrophil Extracellular Trap Induction Requires Mobilization of Both Intracellular and Extracellular Calcium Pools and Is Modulated by Cyclosporine A. *PLoS One* **9**, e97088 (2014).
255. Luppi, F., Longo, A. M., de Boer, W. I., Rabe, K. F. & Hiemstra, P. S. Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation. *Lung Cancer* **56**, 25–33 (2007).
256. Long, X. *et al.* IL-8, a novel messenger to cross-link inflammation and tumor EMT via autocrine and paracrine pathways (Review). *Int. J. Oncol.* **48**, 5–12 (2016).
257. Fousek, K., Horn, L. A. & Palena, C. Interleukin-8: A chemokine at the intersection of cancer plasticity, angiogenesis, and immune suppression. *Pharmacol. Ther.* **219**, 107692 (2021).

258. Ueda, T., Shimada, E. & Urakawa, T. Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: Possible involvement of interleukin-6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis. *J. Gastroenterol.* **29**, 423–429 (1994).
259. Benoy, I. H. *et al.* Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **10**, 7157–7162 (2004).
260. Cheng, D., Kong, H. & Li, Y. Prognostic values of VEGF and IL-8 in malignant pleural effusion in patients with lung cancer. *Biomarkers* **18**, 386–390 (2013).
261. Galffy, G., Mohammed, K. A., Nasreen, N., Ward, M. J. & Antony, V. B. Inhibition of interleukin-8 reduces human malignant pleural mesothelioma propagation in nude mouse model. *Oncol. Res.* **11**, 187–194 (1999).
262. Xu, Y.-D., Cheng, M., Shang, P.-P. & Yang, Y.-Q. Role of IL-6 in dendritic cell functions. *J. Leukoc. Biol.* **111**, 695–709 (2022).
263. Linge, I. *et al.* Pleiotropic Effect of IL-6 Produced by B-Lymphocytes During Early Phases of Adaptive Immune Responses Against TB Infection. *Front. Immunol.* **13**, 750068 (2022).
264. Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J. & Karolina Palucka, A. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat. Immunol.* **1**, 510–514 (2000).
265. Florentin, J. *et al.* Interleukin-6 mediates neutrophil mobilization from bone marrow in pulmonary hypertension. *Cell. Mol. Immunol.* **18**, 374–384 (2021).
266. Dienz, O. & Rincon, M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clin. Immunol.* **130**, 27–33 (2009).
267. Maeda, K., Mehta, H., Drevets, D. A. & Coggeshall, K. M. IL-6 increases B-cell IgG production in a feed-forward proinflammatory mechanism to skew hematopoiesis and elevate myeloid production. *Blood* **115**, 4699–4706 (2010).
268. Fisher, D. T., Appenheimer, M. M. & Evans, S. S. The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Semin. Immunol.* **26**, 38–47 (2014).
269. Yokoyama, A. *et al.* Interleukin 6 Activity in Pleural Effusion: Its Diagnostic Value and Thrombopoietic Activity. *Chest* **102**, 1055–1059 (1992).
270. Zamzam, M. A., Abd El-Aziz, A. A., El Wahsh, R. A., Sonbol, A. A. & Abu El Nour, S. M. Role of interleukin-6 in diagnosis of pleural effusion. *Egypt. J. Chest Dis. Tuberc.* **65**, 173–177 (2016).
271. Kuwabara, T., Ishikawa, F., Kondo, M. & Kakiuchi, T. The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases. *Mediators Inflamm.* **2017**, 3908061 (2017).
272. Zenobia, C. & Hajishengallis, G. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontol. 2000* **69**, 142–159 (2015).
273. Xu, S. & Cao, X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. *Cell. Mol. Immunol.* **7**, 164–174 (2010).

274. Srenathan, U., Steel, K. & Taams, L. S. IL-17+ CD8+ T cells: Differentiation, phenotype and role in inflammatory disease. *Immunol. Lett.* **178**, 20–26 (2016).
275. Hu, S. *et al.* IL-17 Production of Neutrophils Enhances Antibacteria Ability but Promotes Arthritis Development During Mycobacterium tuberculosis Infection. *EBioMedicine* **23**, 88–99 (2017).
276. Chen, J. *et al.* IL-17A Induces Pro-Inflammatory Cytokines Production in Macrophages via MAPKinases, NF- κ B and AP-1. *Cell. Physiol. Biochem.* **32**, 1265–1274 (2013).
277. Ge, Y., Huang, M. & Yao, Y. M. Biology of Interleukin-17 and Its Pathophysiological Significance in Sepsis. *Front. Immunol.* **11**, 1558 (2020).
278. Mitsdoerffer, M. *et al.* Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 14292–14297 (2010).
279. Doreau, A. *et al.* Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat. Immunol.* **10**, 778–785 (2009).
280. Pan, B. *et al.* Interleukin-17 promotes angiogenesis by stimulating VEGF production of cancer cells via the STAT3/GIV signaling pathway in non-small-cell lung cancer. *Sci. Rep.* **5**, 16053 (2015).
281. Murugaiyan, G. & Saha, B. Protumor vs Antitumor Functions of IL-17. *J. Immunol.* **183**, 4169–4175 (2009).
282. Benchetrit, F. *et al.* Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood* **99**, 2114–2121 (2002).
283. Zhang, C. *et al.* Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D. *Hum. Immunol.* **69**, 490–500 (2008).
284. Trinchieri, G. Interleukin-12: A Proinflammatory Cytokine with Immunoregulatory Functions that Bridge Innate Resistance and Antigen-Specific Adaptive Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 251–276 (1995).
285. Akbay, E. A. *et al.* Interleukin-17A Promotes Lung Tumor Progression through Neutrophil Attraction to Tumor Sites and Mediating Resistance to PD-1 Blockade. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* **12**, 1268–1279 (2017).
286. Radosavljevic, G. *et al.* Interleukin-17 may be a valuable serum tumor marker in patients with colorectal carcinoma. *Neoplasma* **57**, 135–144 (2010).
287. Ghahartars, M. *et al.* Investigation of IL-17A Serum Levels in Patients with Nonmelanoma Skin Cancer. *Dermatol. Res. Pract.* **2021**, 5540163 (2021).
288. Wei, X. *et al.* IL-17A–Producing $\gamma\delta$ T Cells Inhibit the Formation of Malignant Pleural Effusions. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **61**, 174–184 (2019).
289. Couper, K. N., Blount, D. G. & Riley, E. M. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J. Immunol.* **180**, 5771–5777 (2008).
290. Saraiva, M., Vieira, P. & O’Garra, A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J. Exp. Med.* **217**, e20190418 (2019).

291. Makita, N., Hizukuri, Y., Yamashiro, K., Murakawa, M. & Hayashi, Y. IL-10 enhances the phenotype of M2 macrophages induced by IL-4 and confers the ability to increase eosinophil migration. *Int. Immunol.* **27**, 131–141 (2015).
292. Lurier, E. B. *et al.* Transcriptome analysis of IL-10-stimulated (M2c) macrophages by next-generation sequencing. *Immunobiology* **222**, 847–856 (2017).
293. Sung, W.-W. *et al.* IL-10 promotes tumor aggressiveness via upregulation of CIP2A transcription in lung adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **19**, 4092–4103 (2013).
294. Xi, J. *et al.* Stimulatory role of interleukin 10 in CD8(+) T cells through STATs in gastric cancer. *Tumour Biol.* **39**, 1010428317706209 (2017).
295. Guo, Y. *et al.* Metabolic reprogramming of terminally exhausted CD8+ T cells by IL-10 enhances anti-tumor immunity. *Nat. Immunol.* **22**, 746–756 (2021).
296. Chen, Y. M., Yang, W. K., Whang-Peng, J., Tsai, C. M. & Perng, R. P. An analysis of cytokine status in the serum and effusions of patients with tuberculous and lung cancer. *Lung cancer* **31**, 25–30 (2001).
297. Wu, X.-Z. *et al.* IL-10 promotes malignant pleural effusion in mice by regulating TH1- and TH17-cell differentiation and migration. *Eur. J. Immunol.* **49**, 653–665 (2019).
298. Wan, Y. Y. & Flavell, R. A. ‘Yin-Yang’ functions of TGF- β and Tregs in immune regulation. *Immunol. Rev.* **220**, 199–213 (2007).
299. Santana, A., Saxena, B., Noble, N. A., Gold, L. I. & Marshall, B. C. Increased expression of transforming growth factor beta isoforms (beta 1, beta 2, beta 3) in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **13**, 34–44 (1995).
300. Prud’homme, G. J. Pathobiology of transforming growth factor β in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations. *Lab. Investig.* **2007** 8711 **87**, 1077–1091 (2007).
301. Saito, A., Horie, M. & Nagase, T. TGF- β Signaling in Lung Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2460 (2018).
302. Sterlacci, W. *et al.* High transforming growth factor β expression represents an important prognostic parameter for surgically resected non-small cell lung cancer. *Hum. Pathol.* **43**, 339–349 (2012).
303. Ivanović, V. *et al.* Elevated plasma TGF-beta1 levels correlate with decreased survival of metastatic breast cancer patients. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **371**, 191–193 (2006).
304. Fukuchi, M. *et al.* Plasma level of transforming growth factor beta1 measured from the azygos vein predicts prognosis in patients with esophageal cancer. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **10**, 2738–2741 (2004).
305. Ivanović, V. *et al.* Elevated plasma levels of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in patients with advanced breast cancer: association with disease progression. *Eur. J. Cancer* **39**, 454–461 (2003).
306. Stockhammer, P. *et al.* Detection of TGF- β in pleural effusions for diagnosis and prognostic stratification of malignant pleural mesothelioma. *Lung cancer* **139**, 124–132

- (2020).
307. Ferrara, N. & Davis-Smyth, T. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocr. Rev.* **18**, 4–25 (1997).
 308. Gerber, H. P., Dixit, V. & Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 13313–13316 (1998).
 309. Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* **1**, 27–31 (1995).
 310. Ferrara, N., Gerber, H.-P. & LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* **9**, 669–676 (2003).
 311. Gabrilovich, D. I. *et al.* Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.* **2**, 1096–1103 (1996).
 312. Tamura, R. *et al.* The role of vascular endothelial growth factor in the hypoxic and immunosuppressive tumor microenvironment: perspectives for therapeutic implications. *Med. Oncol.* **37**, 2 (2019).
 313. Salgado, R. *et al.* Platelets and vascular endothelial growth factor (VEGF): a morphological and functional study. *Angiogenesis* **4**, 37–43 (2001).
 314. Shen, Y.-C. *et al.* Diagnostic accuracy of vascular endothelial growth factor for malignant pleural effusion: A meta-analysis. *Exp Ther Med* **3**, 1072–1076 (2012).
 315. Psatha, A. *et al.* A potential role for VEGF in the diagnostic approach of pleural effusions. *J. Thorac. Dis.* **8**, 1681–1687 (2016).
 316. Zaldivar, M. M. *et al.* CXC chemokine ligand 4 (Cxcl4) is a platelet-derived mediator of experimental liver fibrosis. *Hepatology* **51**, 1345–1353 (2010).
 317. Scheuerer, B. *et al.* The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages. *Blood* **95**, 1158–1166 (2000).
 318. Liu, C. Y. *et al.* Platelet Factor 4 Differentially Modulates CD4+CD25+ (Regulatory) versus CD4+CD25- (Nonregulatory) T Cells. *J. Immunol.* **174**, 2680–2686 (2005).
 319. Fleischer, J. *et al.* Platelet Factor 4 Inhibits Proliferation and Cytokine Release of Activated Human T Cells. *J. Immunol.* **169**, 770–777 (2002).
 320. Nesmelova, I. V *et al.* Platelet factor 4 and interleukin-8 CXC chemokine heterodimer formation modulates function at the quaternary structural level. *J. Biol. Chem.* **280**, 4948–4958 (2005).
 321. Gengrinovitch, S. *et al.* Platelet Factor-4 Inhibits the Mitogenic Activity of VEGF121 and VEGF165 Using Several Concurrent Mechanisms (*). *J. Biol. Chem.* **270**, 15059–15065 (1995).
 322. Lasagni, L. *et al.* An Alternatively Spliced Variant of CXCR3 Mediates the Inhibition of Endothelial Cell Growth Induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and Acts as Functional Receptor for Platelet Factor 4. *J. Exp. Med.* **197**, 1537–1549 (2003).

323. Mueller, A. *et al.* CXCL4-induced migration of activated T lymphocytes is mediated by the chemokine receptor CXCR3. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 875–882 (2008).
324. Lishko, V. K., Yakubenko, V. P., Ugarova, T. P. & Podolnikova, N. P. Leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18, α M β 2, CR3) acts as a functional receptor for platelet factor 4. *J. Biol. Chem.* **293**, 6869–6882 (2018).
325. Bikfalvi, A. Platelet factor 4: An inhibitor of angiogenesis. *Semin. Thromb. Hemost.* **30**, 379–385 (2004).
326. Maione, T. E., Gray, G. S., Hunt, A. J. & Sharpe, R. J. Inhibition of tumor growth in mice by an analogue of platelet factor 4 that lacks affinity for heparin and retains potent angiostatic activity. *Cancer Res.* **51**, 2077–2083 (1991).
327. Liang, P. *et al.* Platelet Factor 4 Potently Inhibits Tumor Cell Growth and Angiogenesis In Multiple Myeloma. *Blood* **116**, 4173 (2010).
328. Pucci, F. *et al.* PF4 Promotes Platelet Production and Lung Cancer Growth. *Cell Rep.* **17**, 1764–1772 (2016).
329. Peterson, J. E. *et al.* VEGF, PF4 and PDGF are elevated in platelets of colorectal cancer patients. *Angiogenesis* **15**, 265–273 (2012).
330. Dick, I. M. *et al.* Profile of soluble factors in pleural effusions predict prognosis in mesothelioma. *Cancer Biomarkers* **33**, 159–169 (2022).
331. Ley, K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol. Med.* **9**, 263–268 (2003).
332. Etulain, J. *et al.* P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. *Blood* **126**, 242–246 (2015).
333. Ivanov, I. I., Apta, B. H. R., Bonna, A. M. & Harper, M. T. Platelet P-selectin triggers rapid surface exposure of tissue factor in monocytes. *Sci. Rep.* **9**, 13397 (2019).
334. da Costa Martins, P. A., van Gils, J. M., Mol, A., Hordijk, P. L. & Zwaginga, J. J. Platelet binding to monocytes increases the adhesive properties of monocytes by up-regulating the expression and functionality of beta1 and beta2 integrins. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 499–507 (2006).
335. Kulidjian, A. A., Issekutz, A. C. & Issekutz, T. B. Differential role of E-selectin and P-selectin in T lymphocyte migration to cutaneous inflammatory reactions induced by cytokines. *Int. Immunol.* **14**, 751–760 (2002).
336. Kisucka, J. *et al.* Elevated levels of soluble P-selectin in mice alter blood-brain barrier function, exacerbate stroke, and promote atherosclerosis. *Blood* **113**, 6015–6022 (2009).
337. Shamay, Y. *et al.* P-selectin is a nanotherapeutic delivery target in the tumor microenvironment. *Sci. Transl. Med.* **8**, 345ra87 (2016).
338. Kim, Y. J., Borsig, L., Varki, N. M. & Varki, A. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 9325–9330 (1998).
339. Roselli, M. *et al.* Soluble selectin levels in patients with lung cancer. *Int. J. Biol. Markers* **17**, 56–62 (2002).

340. Majchrzak-Baczmańska, D. B., Głowacka, E., Wilczyński, M. & Malinowski, A. Serum concentrations of soluble (s)L- and (s)P-selectins in women with ovarian cancer. *Prz. Menopauzalny* **17**, 11–17 (2018).
341. Blumberg, N., Spinelli, S. L., Francis, C. W., Taubman, M. B. & Phipps, R. P. The platelet as an immune cell-CD40 ligand and transfusion immunomodulation. *Immunol. Res.* **45**, 251–260 (2009).
342. Henn, V. *et al.* CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* **391**, 591–594 (1998).
343. Suttles, J. & Stout, R. D. Macrophage CD40 signaling: A pivotal regulator of disease protection and pathogenesis. *Semin. Immunol.* **21**, 257–264 (2009).
344. Ma, D. Y. & Clark, E. A. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin. Immunol.* **21**, 265–272 (2009).
345. Cipollone, F. *et al.* Enhanced soluble CD40 ligand contributes to endothelial cell dysfunction in vitro and monocyte activation in patients with diabetes mellitus: effect of improved metabolic control. *Diabetologia* **48**, 1216–1224 (2005).
346. Perazzio, S. F. *et al.* Soluble CD40L is associated with increased oxidative burst and neutrophil extracellular trap release in Behçet's disease. *Arthritis Res. Ther.* **19**, 235 (2017).
347. Schlom, J., Jochems, C., Gulley, J. L. & Huang, J. The role of soluble CD40L in immunosuppression. *Oncoimmunology* **2**, e22546 (2013).
348. Huang, J. *et al.* Elevated serum soluble CD40 ligand in cancer patients may play an immunosuppressive role. *Blood* **120**, 3030–3038 (2012).
349. ANGELOU, A. *et al.* The Role of Soluble CD40L Ligand in Human Carcinogenesis. *Anticancer Res.* **38**, 3199 LP – 3201 (2018).
350. Bailly, C., Thuru, X. & Quesnel, B. Soluble Programmed Death Ligand-1 (sPD-L1): A Pool of Circulating Proteins Implicated in Health and Diseases. *Cancers (Basel)*. **13**, 3034 (2021).
351. Zamora Atenza, C. *et al.* The integration of systemic and tumor PD-L1 as a predictive biomarker of clinical outcomes in patients with advanced NSCLC treated with PD-(L)1blockade agents. *Cancer Immunol. Immunother.* **71**, 1–13 (2022).
352. Rolfes, V. *et al.* PD-L1 is expressed on human platelets and is affected by immune checkpoint therapy. *Oncotarget* **9**, 27460–27470 (2018).
353. Xia, Q. *et al.* Immune Checkpoint Receptors Tim-3 and PD-1 Regulate Monocyte and T Lymphocyte Function in Septic Patients. *Mediators Inflamm.* **2018**, 1632902 (2018).
354. El-Benna, J. & Dang, P. M.-C. Live or die: PD-L1 delays neutrophil apoptosis. *Blood* **138**, 744–746 (2021).
355. Ilić, M. *et al.* Detection of PD-L1 in circulating tumor cells and white blood cells from patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **29**, 193–199 (2018).
356. Arrieta, O. *et al.* Expression of PD-1/PD-L1 and PD-L2 in peripheral T-cells from non-

- small cell lung cancer patients. *Oncotarget* **8**, 101994–102005 (2017).
357. Yajuk, O. *et al.* The PD-L1/PD-1 Axis Blocks Neutrophil Cytotoxicity in Cancer. *Cells* **10**, (2021).
 358. Pu, Y. & Ji, Q. Tumor-Associated Macrophages Regulate PD-1/PD-L1 Immunosuppression. *Front. Immunol.* **13**, 874589 (2022).
 359. Abiko, K. *et al.* IFN- γ from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *Br. J. Cancer* **112**, 1501–1509 (2015).
 360. Zhang, X. *et al.* PD-L1 induced by IFN- γ from tumor-associated macrophages via the JAK/STAT3 and PI3K/AKT signaling pathways promoted progression of lung cancer. *Int. J. Clin. Oncol.* **22**, 1026–1033 (2017).
 361. Oh, S. Y. *et al.* Soluble PD-L1 is a predictive and prognostic biomarker in advanced cancer patients who receive immune checkpoint blockade treatment. *Sci. Rep.* **11**, 19712 (2021).
 362. Ghanim, B. *et al.* Tumour cell PD-L1 expression is prognostic in patients with malignant pleural effusion: the impact of C-reactive protein and immune-checkpoint inhibition. *Sci. Rep.* **10**, 5784 (2020).
 363. Korniejewska, A., Mcknight, A. J., Johnson, Z., Watson, M. L. & Ward, S. G. Expression and agonist responsiveness of CXCR3 variants in human T lymphocytes. *Immunology* **132**, 503–515 (2011).
 364. Fox, J. M. *et al.* CXCL4/Platelet Factor 4 is an agonist of CCR1 and drives human monocyte migration. *Sci. Rep.* **8**, 9466 (2018).
 365. Spaks, A. *et al.* CXC chemokine ligand 4 (CXCL4) is predictor of tumour angiogenic activity and prognostic biomarker in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients undergoing surgical treatment. *Biomarkers* **21**, 474–8 (2016).
 366. Lasagni, L. *et al.* PF-4/CXCL4 and CXCL4L1 exhibit distinct subcellular localization and a differentially regulated mechanism of secretion. *Blood* **109**, 4127–4134 (2007).
 367. Schaffner, A., Rhyn, P., Schoedon, G. & Schaer, D. J. Regulated expression of platelet factor 4 in human monocytes--role of PARs as a quantitatively important monocyte activation pathway. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 202–209 (2005).
 368. Deng, S. *et al.* Non-platelet-derived CXCL4 differentially regulates cytotoxic and regulatory T cells through CXCR3 to suppress the immune response to colon cancer. *Cancer Lett.* **443**, 1–12 (2019).
 369. Borsig, L. The role of platelet activation in tumor metastasis. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **8**, 1247–1255 (2008).
 370. Souza, A. G. de *et al.* Cell-free DNA promotes malignant transformation in non-tumor cells. *Sci. Rep.* **10**, 21674 (2020).
 371. Olsson, A. K. & Cedervall, J. NETosis in Cancer – Platelet–Neutrophil Crosstalk Promotes Tumor-Associated Pathology. *Front. Immunol.* **7**, 373 (2016).
 372. Carmona-Rivera, C., Zhao, W., Yalavarthi, S. & Kaplan, M. J. Neutrophil extracellular traps induce endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus through the

- activation of matrix metalloproteinase-2. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 1417–24 (2015).
373. Chen, Y., Han, L., Qiu, X., Wang, G. & Zheng, J. Neutrophil Extracellular Traps in Digestive Cancers: Warrior or Accomplice. *Front. Oncol.* **11**, 766636 (2021).
374. Okubo, K. *et al.* Lactoferrin Suppresses Neutrophil Extracellular Traps Release in Inflammation. *EBioMedicine* **10**, 204–215 (2016).
375. Kaltenmeier, C. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Promote T Cell Exhaustion in the Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* **12**, 785222 (2021).
376. Martinez, N. E. *et al.* Tetrahydroisoquinolines: New Inhibitors of Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation. *ChemBioChem* **18**, 888–893 (2017).
377. Meier, A. *et al.* Inhibition of human neutrophil extracellular trap (NET) production by propofol and lipid emulsion. *Front. Pharmacol.* **10**, 323 (2019).