

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



**Caracterización del repertorio de receptores de
linfocitos T de sangre periférica en pacientes con
carcinoma de pulmón no microcítico
tratados con inmunoterapia**

TRABAJO FINAL DE MÁSTER
EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ANTOLINA PANIZZA

TUTOR UPV: ELOISA JANTUS LEWINTRE
TUTOR FIHGUV: SILVIA CALABUIG FARIÑAS

CURSO ACADÉMICO: 2018-2020

VALENCIA, SEPTIEMBRE 2020

Título: Caracterización del repertorio de receptores de linfocitos T de sangre periférica en pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico tratados con inmunoterapia

Introducción: El cáncer de pulmón representa la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo, con una supervivencia global a los 5 años inferior al 15%. La estrategia terapéutica basada en bloqueantes de puntos de control inmune (ICB), como la inhibición del eje PD-1 /PD-L1 con anticuerpos monoclonales, permite reestablecer la inmunidad antitumoral mediada por células T. La expresión de PD-L1 como biomarcador es insuficiente para la selección de pacientes debido a que no todos se benefician de esta terapia. Es necesario la búsqueda de nuevos biomarcadores predictivos. El objetivo del trabajo es caracterizar el repertorio de receptores de linfocitos T (TCR) en una cohorte de pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM) en estadios avanzados tratados con anti-PD1.

Materiales y Métodos: Se secuenció mediante secuenciación de próxima generación (NGS) la región CDR3 del receptor TCR β en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de 15 pacientes con CPNM en estadios avanzados tratados con anti-PD-1 en primera línea (Pembrolizumab). Los PMBC fueron aislados de muestras sanguíneas tomadas pretratamiento y post tratamiento (primera evaluación por imagen). Las características del repertorio TCR periférico (riqueza, diversidad, clonalidad, convergencia y composición de segmentos V y J) pre, post y % de cambio se correlacionaron con características clinicopatológicas y variables pronósticas.

Resultados: Se consiguió una profundidad de un millón o más de lecturas por librería con una longitud media de 80 pares de base. Cuando se analiza las características del repertorio se observa que los pacientes fumadores mostraron menor riqueza ($p=0,01$) y diversidad ($p=0,05$) comparado con no fumadores. Los pacientes ≥ 60 años presentaron una convergencia superior a los más jóvenes ($p=0,037$). No se observó correlación entre los índices de diversidad y los resultados clínicos. Los segmentos TRBV20_1 y TRBJ1_1 fueron los más frecuentes en todas las muestras. Se evidencia mayor frecuencia de clonotipos con segmento TRBV7-4 en pacientes sin beneficio clínico ($p=0,003$) y menor SLP ($p=0,004$). Mientras que TRBV11-1 predomina en pacientes con beneficio clínico (pre, $p= 0,025$ y post, $p=0,018$). Además, ciertos clonotipos (TRBV6_1, TRBV6_4, TRBV7_7, TRBV9 y TRBJ2_6) disminuyen en circulación ante una respuesta favorable. Por otro lado, la mayor cantidad de clonotipos nuevos de alta frecuencia predispone a una respuesta antitumoral desfavorable ($p=0,05$).

Conclusión: Estos resultados sugieren que el repertorio TCR β presenta un alto potencial para ser considerado biomarcador predictivo de respuesta a ICB. Sin embargo, se requieren estudios adicionales en una cohorte mayor para validar estos hallazgos.

Palabras claves: TCR, carcinoma de pulmón no microcítico, inmunoterapia, bloqueo de puntos de control inmune, NGS, biomarcadores.

AUTORA: Antolina Panizza

LOCALIDAD Y FECHA: Valencia, septiembre de 2020

TUTOR ACADÉMICO: Eloisa Jantus Lewintre

TUTOR INSTITUCIÓN: Silvia Calabuig Fariñas

TITLE: Characterization of the T-cell receptor (TCR) repertoire of the peripheral blood in patients with non-small cell lung carcinoma treated with immunotherapy

Background: Lung cancer is the leading cause of cancer-related death around the world, with an overall 5-year survival less than 15%. The therapeutic strategy based on immune checkpoint blockade (ICB), such as targeting the PD-1 / PD-L1 axis with monoclonal antibodies, allows T cell-mediated anti-tumor immunity to be restored. PD-L1 expression testing alone is not yet an adequate biomarker for patient selection due not all patients benefit from this treatment. Thus, it is necessary to identify new Predictive Biomarkers. The aim of this study is to characterize the T-cell receptor (TCR) repertoire in a cohort of advanced NSCLC patients treated with anti-PD1.

Methods: NGS was used to sequencing region CDR3 of TCR β chain in PBMCs from 15 advanced NSCLC patients treated with anti-PD-1 first-line (pembrolizumab). PBMCs were isolated from blood samples collected pre-treatment and post- treatment (at first response assessment). The characteristics of the peripheral TCR repertoire (richness, Shannon diversity, clonality, convergence and composition of V and J segments) pre, post-treatment and % of change were correlated with clinicopathological characteristics and prognostic variables.

Results: A depth of one million or more reads per library was achieved with a mean read length of ~80 bp. We found that smokers showed significantly lower richness ($p=0.01$) and Shannon diversity ($p=0.05$) when compared to non-smokers. Patients ≥ 60 years of age had a higher convergence than the younger ones ($p = 0.037$). No correlation was observed between diversity indices and clinical outcomes. TRBV20_1 and TRBJ1_1 was the most frequent in all samples. There was a higher frequency of clonotypes with TRBV7-4 segment in patients without clinical benefit ($p = 0.003$) and lower PFS ($p = 0.004$). While TRBV11-1 was detected more in patients with clinical benefit (pre, $p= 0.025$ y post, $p=0.018$). In addition, certain clonotypes (TRBV6_1, TRBV6_4, TRBV7_7, TRBV9 and TRBJ2_6) decrease in circulation in patients with favourable response. On the other hand, the greater number of new high frequency clonotypes predisposes to an unfavourable antitumor response ($p = 0.05$).

Conclusion: These results suggest that the TCR β repertoire has a high potential to be considered a predictive biomarker of response to ICB. However, additional studies in a larger cohort are required to validate these findings.

Key words: TCR, non-small cell lung cancer, immunotherapy, immune checkpoint blockades, NGS, biomarkers.

Author: Antolina Panizza

Location and date: Valencia, September 2020

Academic supervisor: Eloisa Jantus Lewintre

Institution supervisor: Silvia Calabuig Fariñas

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a la Dra. Eloisa Jantus y al Dr. Carlos Camps por abrirme las puertas al Laboratorio de Oncología Molecular de la FIHGUV para realizar este trabajo y darme la oportunidad de participar de las reuniones y seminarios del Servicio de Oncología del hospital.

A la Dra. Eloisa Jantus por transmitirme su pasión por la oncología molecular e inmunología, por su capacidad para guiarme, enseñarme y tenerme presente para nuevos proyectos.

A la Dra. Silvia Calabuig, por su dedicación y compromiso, por aclararme cada duda y brindarme tranquilidad en los momentos de ansiedad.

A cada uno de mis compañeros del laboratorio de Oncología Molecular de la FIHGUV, por compartir sus conocimientos y hacerme sentir como en casa.

Al equipo de secuenciación NGS, Sandra y Andrea, por enseñarme este mundo increíble de la biología molecular, por la buena predisposición.

En especial, a Clara (Ning), por compartir sus conocimientos en secuenciación de TCR, por su paciencia y buena energía, aún en los momentos más difíciles. Una excelente persona, gracias, compañera.

Al Programa Bec.ar del Ministerio de Educación de Argentina y SEPIE, por otorgarme la posibilidad de seguir formándome profesionalmente.

A mis compañeros del máster, por tan buenos momentos compartidos y regalarme nuevas amistades.

A mis compañeros de beca, mi familia argentina en Valencia, por atravesar juntos esta etapa tan importante. A Fer, por su apoyo incondicional en todo momento.

A mis amigos de Pinto y Rosario, por estar tan cerca, virtualmente o los que pudieron cruzar “el charco” para tomar unos mates... Gracias por hacerme sentir que nada había cambiado.

A mi mamá, por apoyarme y confiar en cada una de mis nuevas decisiones y proyectos, aunque fuera dejarlo todo y volar tan lejos. A mis hermanas, Vicky y Bianca, por estar siempre presentes en todo, sin dudar. A mi abuela, por acompañarme y adaptarse a cada cambio. A mi papá, por haberme dejado fuerzas para perseguir mis sueños. Sin ustedes, no lo podría haber logrado.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CONCEPTO DE CÁNCER	1
1.2. MICROAMBIENTE TUMORAL Y RESPUESTA INMUNE TUMORAL	1
1.2.1. Procesamiento y presentación antigénica.....	2
1.2.2. Ciclo cáncer- inmunidad	3
1.2.3. Inmunoección del cáncer	4
1.2.4. Puntos de control inmune	5
1.3. CÁNCER DE PULMÓN	6
1.3.1. Epidemiología	6
1.3.2. Factores de riesgo	7
1.3.3. Diagnóstico	7
1.3.4. Estadificación y pronóstico	7
1.3.5. Clasificación	7
1.3.6. Tratamiento	8
1.4. INMUNOTERAPIA: BLOQUEANTES DE LOS PUNTOS DE CONTROL INMUNE.....	8
1.5. BIOMARCADORES	10
1.5.1. Situación actual	10
1.5.2. Nuevas aproximaciones.....	11
1.6. TCR	11
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. PACIENTES Y MUESTRAS	16
3.2. EXTRACCIÓN DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA.....	16
3.3. RNA.....	17
3.3.1. Extracción y purificación de RNA	17
3.3.2. Cuantificación del RNA extraído	17
3.3.3. Determinación de la integridad del RNA extraído	17
3.3.4. Reacción de retrotranscripción.....	17
3.4. SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN CDR3 β DEL TCR	17
3.4.1. Preparación de librerías.....	17
3.4.2. Cuantificación de librerías	18
3.4.3. Preparación del templado	19
3.4.4. Secuenciación de nueva generación NGS.....	20
3.5. ANÁLISIS DEL REPERTORIO TCR- β	22

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1. DESCRIPCIÓN DE LA COHORTE DE PACIENTES EN ESTUDIO.....	25
4.2. CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL RNA EXTRAÍDO DE LINFOCITOS ...	25
4.3. RESULTADOS DE LA SECUENCIACIÓN.....	26
4.4. ANÁLISIS DE LOS ÍNDICES DE DIVERSIDAD Y CONVERGENCIA DEL REPERTORIO TCR BETA.....	26
4.4.1. Evaluación de las características del repertorio TCR β según características demográficas y hábito tabáquico de los pacientes.....	27
4.4.2. Evaluación de las características del repertorio TCR β según la respuesta al tratamiento y variables pronósticas.	30
4.4.2.1. Índices pretratamiento.....	31
4.4.2.2. Índices post tratamiento.....	32
4.4.2.3. Dinámica de índices.....	34
4.5. ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA DE SEGMENTOS V Y J	35
4.5.1. Análisis de la frecuencia de segmentos V y J pretratamiento	36
4.5.2. Análisis de la frecuencia de segmentos V y J post tratamiento.....	38
4.5.3. Dinámica de frecuencia de segmentos V y J.....	40
4.6. ANÁLISIS DE SECUENCIAS CDR3 NT Y CDR3 AA QUE CONFORMAN EL REPERTORIO TCR β	42
4.6.1. Clonotipos CDR3 NT	42
4.6.2. Clonotipos CDR3 AA	43
5. CONCLUSIONES	46
6. BIBLIOGRAFÍA.....	47
7. ANEXOS	51
7.1. GRÁFICAS SUPLEMENTARIAS.....	51
7.2. TABLAS SUPLEMENTARIAS	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las diez propiedades del cáncer.....	1
Figura 2. Representación de los componentes del microambiente tumoral	2
Figura 3. Presentación antigénica.....	3
Figura 4. Ciclo cáncer-inmunidad	4
Figura 5. Fases del proceso de inmunomedición en cáncer.....	5
Figura 6. Vías de señalización tras la unión del ligando PD-L1/2 al receptor PD- 1 en la célula T.....	6
Figura 7. Clasificación histológica de cáncer de pulmón.....	8
Figura 8. Inmunoterapia: bloqueantes de los puntos de control inmune.....	9
Figura 9. Estructura del receptor de TCR α/β	12
Figura 10. Recombinación VDJ en el locus de la cadena β	13
Figura 11. Estructura génica de la región CDR3 β	14
Figura 12. Obtención de células mononucleares con centrifugación en gradiente de densidad.	16
Figura 13. Amplificación de la región CDR3 de la cadena β del TCR.....	18
Figura 14. Proceso de ligación de adaptadores.....	18
Figura 15. Esquema de PCR con sondas TaqMan®	19
Figura 16. PCR en emulsión.....	20
Figura 17. Esquema de secuenciación por síntesis.....	20
Figura 18. Flujo de nucleótidos en una carrera de secuenciación.....	21
Figura 19. Distribución de lecturas obtenidas por librería.....	26
Figura 20. Convergencia en función de la edad.....	28
Figura 21. Diversidad y <i>evenness</i> en función de la edad.....	29
Figura 22. Riqueza y diversidad de Shannon pretratamiento en función del hábito tabáquico.	30
Figura 23. Características del repertorio TCR pretratamiento, según respuesta al tratamiento.	31
Figura 24. Características del repertorio TCR post tratamiento, según respuesta al tratamiento.	33
Figura 25. Dinámica de las características del repertorio TCR, según respuesta al tratamiento.	34
Figura 26. Frecuencia de segmentos V pretratamiento.....	36
Figura 27. Frecuencia de segmentos J pretratamiento.....	36
Figura 28. Relación entre respuesta al tratamiento o beneficio clínico a ICB y frecuencia de segmentos V pretratamiento	37
Figura 29. Kaplan-Meier para frecuencia de segmento TRBV7_4 asociada a SLP.....	37
Figura 30. Frecuencia de segmentos V post tratamiento.	38
Figura 31. Frecuencia de segmentos J post tratamiento.	38
Figura 32. Relación entre respuesta al tratamiento con ICB y frecuencia segmentos V post tratamiento.	39
Figura 33. Relación entre beneficio clínico a ICB y frecuencia segmentos V post tratamiento.	40
Figura 34. Dinámica de frecuencia de segmentos V según respuesta al tratamiento con ICB	41
Figura 35. Dinámica de clonotipos con segmentos J según respuesta al tratamiento con ICB.....	41
Figura 36. Dinámica de clonotipos con segmentos V según beneficio clínico a ICB.....	42
Figura 37. Clonotipos CDR3NT nuevos dentro de los 100 más frecuentes post tratamiento.....	43
Figura 38. Características del repertorio TCR de sangre periférica pre y post tratamiento en una respuesta favorable.	45
Figura S1. Ratio frecuencias (POST/PRE) segmentos V.....	51
Figura S2. Ratio frecuencias (POST/PRE) segmentos J.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métricas de calidad de la carrera de secuenciación.	22
Tabla 2. Clasificación de las lecturas obtenidas en la secuenciación.....	22
Tabla 3. Características demográficas y clínico-patológicas de los pacientes.....	25
Tabla 4. Valores de índices del repertorio TCR β para cada paciente.	27
Tabla 5. Características del repertorio TCR β según características demográficas de los pacientes	28
Tabla 6. Clonotipos convergentes del paciente 8.....	44
Tabla 7. Clonotipos convergente del paciente 15.	44
Tabla S1. Descriptores T, N y M para la 8ª edición de la clasificación TNM del cáncer de pulmón	52
Tabla S2. Estadificación del cáncer de pulmón, TNM 8ª edición	53
Tabla S3. Características demográficas de cada uno de los pacientes	53
Tabla S4. Características clinicopatológicas de cada uno de los pacientes.....	54
Tabla S5. Métricas de calidad de las carreras de secuenciación	54

ABREVIATURAS

ADC: Adenocarcinoma
ALK: Quinasa de linfoma anaplásico (*Anaplastic lymphoma kinase*)
BC: Beneficio clínico
BRAF: Protooncogén B-Raf, serina treonina quinasa
CAF: Células fibroblásticas asociadas al cáncer (*cancer associated fibroblast*)
CD: Células dendríticas
CD28: Receptor coestimulación (*Cluster of Differentiation 28*)
CDKN2A: Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina (*cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A*)
CDR: Regiones determinantes de complementariedad (*complementarity-determining regions*)
CDR3: Regiones determinantes de complementariedad 3 (*complementarity-determining regions 3*)
CPA: Células presentadoras de antígenos
CPNM: Carcinoma pulmonar no microcítico
CT: Ciclo umbral (*cycle threshold*).
CTL o CD8+: Linfocitos T citotóxicos
CTLA-4: Antígeno 4 del linfocito T citotóxico (*cytotoxic T lymphocyte associated- antigen 4*)
DAMP: Patrones moleculares asociados al daño (*damage associated molecular patterns*)
dMMR: Deficiencia en reparación de errores de mal apareamiento (*deficient MisMatch Repair*)
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DNAc: DNA complementario.
E: Índice *evenness*
ECM: Matriz extracelular (*extracellular matrix*)
EDTA: Anticoagulante ácido etilendiaminetetraacético (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*)
EE: Enfermedad estable
EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal growth factor receptor*)
FDA: Administración de alimentos y medicamentos (*Food and Drug Administration*)
FGFR1: Receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor Receptor 1*)
FRET: Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (*fluorescence resonance energy transfer*)
H: Índice de diversidad Shannon
ICB: Inhibidor de puntos de control inmune (*immune checkpoint blockers*)
ICOS: Coestimulador de células T inducible (*Inducible T-cell COStimulator*)
ICP: puntos de control inmune (*Immune Checkpoint*)
IFN - γ : Interferón gamma.
IL-10: Interleucina-10
IMGT[®]: *International ImMunoGeneTics information system[®]*
ISP: Partícula esférica (*Ion Sphera Particle*)
ITIM: Inmunoreceptor con motivos de inhibición basados en tirosinas (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*)
ITSM: Inmunoreceptor con motivos intercambiables basados en tirosina (*immunoreceptor tyrosine-based switch motif*)
KRAS: Homólogo del oncogén viral del sarcoma de la rata de Kirsten (*kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*)
MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinase*)
MDSC: Células mieloides supresoras (*myeloid-derived suppressor cell*)
MET: Protooncogén, receptor de tirosina quinasa
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex*)
MSI-H: Inestabilidad de microsatélites (*microsatellite instability-high*)
NBC: No beneficio clínico
NGS: Secuenciación de próxima generación (*next generation sequencing*)

NK: Células *natural killers*

NR: No respondedores

NTRK: Receptor de tirosina quinasa neurotrófico (*Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase*)

OMS: Organización mundial de la salud

PBS: Tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PD-1: Proteína 1 de muerte celular programada (*programmed cell death protein 1*)

PD-L1: Ligando 1 de muerte celular programada (*programmed Death-ligand 1*)

PD-L2: Ligando 2 de muerte celular programada (*programmed Death-ligand 2*)

PE: Progresión de enfermedad

PI3K: Fosfatidilinositol- 3-quinasa (*phosphatidylinositol 3-kinase*)

PIK3CA: Fosfoinositol 3-quinasa polipéptido catalítico alfa (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit Alpha*)

PMBC: Células mononucleares de sangre periférica (*peripheral blood mononuclear cell*)

PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (*Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase*)

PTPs: Fosfatasa de tirosinas (*Protein tyrosine phosphatases*)

qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real

R: Respondedores

RAG1/2: Proteínas del gen de activación de recombinación (*recombination activation gene*).

RECIST: Criterio de Evaluación a Respuesta en Tumores Sólidos (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*)

RET: Protooncogén RET, receptor tirosina quinasa

RIN: Número de integridad de RNA (*RNA Integrity number*)

RNA: Ácido ribonucleico

ROS1: protooncogén ROS1, receptor tirosina quinasa

RP: Respuesta parcial

RSS: Secuencias señal de recombinación (*recombination signal sequences*)

SG: Supervivencia global

SLP: Supervivencia libre de progresión

TAA: Antígenos asociados al tumor (*Tumor-Associated Antigens*)

TAM: Macrófagos asociados al tumor (*Tumor associated macrophages*)

TCR: Receptor de linfocitos T (*T cell receptor*)

TdT: Enzima desoxinucleotidil terminal-transferasa

TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta (*transforming growth factor beta*)

Th o CD4+: Linfocitos T colaboradores

TIL: Linfocitos infiltrantes de tumor (*Tumor-infiltrating lymphocytes*)

TKI: Inhibidores de tirosina quinasa (*Tyrosine kinase inhibitors*)

TMB: Carga mutacional tumoral (*tumor mutation burden*)

TME: Microambiente tumoral (*tumor microenvironment*)

TNF: Factor de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor*)

TSA: Antígenos específicos de tumor (*Tumor-specific antigens*)

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONCEPTO DE CÁNCER

Según la Organización Mundial de la Salud, el término cáncer engloba un amplio grupo de enfermedades que se caracterizan por el desarrollo de células anormales que se dividen, crecen y diseminan en forma incontrolada; también se denomina “tumor maligno” o “neoplasia maligna”. En consecuencia, el tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo. Existen más de 200 tipos distintos de cánceres que pueden ser encontrados en órganos específicos y cada tipo se divide en varios subtipos de tumores (OMS, 2020).

La tumorigénesis implica una sucesión y acumulación de cambios genéticos que confieren algún tipo de ventaja en el crecimiento, conduciendo a la transformación progresiva de células normales en células malignas (Hanahan y Weinberg ,2000).

En el año 2000, Hanahan y Weinberg describieron seis alteraciones esenciales en la fisiología celular que conjuntamente condicionan el crecimiento maligno. Estas son: autonomía en las señales de crecimiento, evasión de las señales inhibitoras de crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, inducción de angiogénesis e, invasión y metástasis (Hanahan y Weinberg ,2000). Posteriormente, en el año 2011, incluyeron cuatro alteraciones más: inestabilidad genómica y mutagénesis, metabolismo energético desregulado, microambiente inflamatorio alterado y evasión de la respuesta inmune, siendo estas dos últimas en las que nos centraremos en el presente trabajo (Hanahan y Weinberg ,2011) (figura 1).



Figura 1. Las diez propiedades del cáncer (Hanahan y Weinberg ,2011).

1.2. MICROAMBIENTE TUMORAL Y RESPUESTA INMUNE TUMORAL

La visión actual de los tumores comprende a las células tumorales como integrantes de un ecosistema, el microambiente tumoral (TME por sus siglas en inglés, *tumor microenvironment*), compuesto por una matriz extracelular (ECM por sus siglas en inglés, *extracellular matrix*) y diferentes tipos celulares presentes en el estroma, entre ellas: células inmunes infiltrantes, células endoteliales y

fibroblastos asociadas al tumor (CAF por sus siglas en inglés, *cancer associated fibroblast*) (Quail y Joyce, 2013).

Los fibroblastos asociados al tumor (CAF) secretan componentes de la matriz extracelular y las células endoteliales contribuyen a la angiogénesis.

El infiltrado inmune perteneciente a la inmunidad innata y adaptativa está implicado en promover la eliminación de las células tumorales.

La primer línea de defensa la constituye los componentes de la inmunidad innata conformada por: leucocitos polimorfonucleares (granulocitos), macrófagos asociados al tumor (TAM por su siglas en inglés, *tumor-associated macrophage*), células dendríticas (CD), mastocitos, células mieloides supresoras (MDSC por sus siglas en inglés, *myeloid-derived suppressor cell*) y *natural killers* (NK). Estas células mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados al daño (DAMP por sus siglas en inglés, *damage associated molecular patterns*) liberados por las células tumorales, responden secretando citoquinas y quimioquinas para reclutar más células inmunes. Además, tiene lugar la acción citolítica de los NK. Asimismo, las células dendríticas y macrófagos, denominadas células presentadoras de antígenos (CPA), son el nexo con la inmunidad adaptativa ya que promueven la activación y proliferación de células específicas contra el tumor, mediante la presentación de antígenos (Gajewski et al., 2013)

Los componentes celulares de la inmunidad adaptativa corresponden a linfocitos T y B. Los linfocitos B sintetizan anticuerpos. Para los linfocitos T existen dos tipos principales: colaboradores (T helpers, Th) que se caracterizan por ser CD4+ y citotóxicos (CTL) que son CD8+; expresando, además, receptores específicos de antígenos en su membrana (Gajewski et al., 2013) (figura 2).

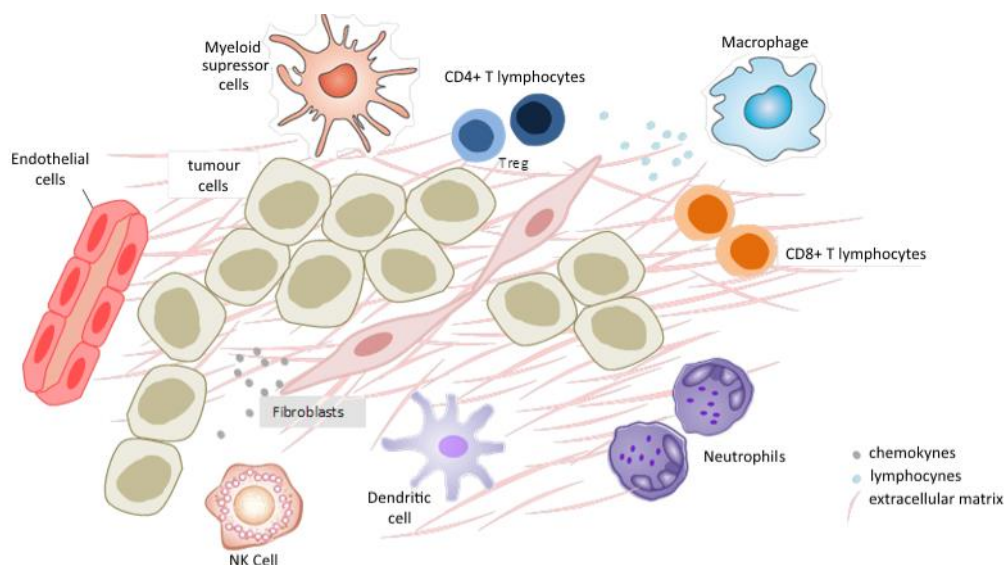


Figura 2. Representación de los componentes del microambiente tumoral (Jantus-Lewintre y Usó, 2015).

La acción del sistema inmune sobre las células tumorales se detallará en los apartados siguientes.

1.2.1. Procesamiento y presentación antigénica

Los antígenos liberados por las células tumorales son captados por las células presentadoras de antígenos. Estos antígenos pueden clasificarse en dos clases: antígenos asociados al tumor (TAA, por sus siglas en inglés *Tumor-Associated Antigens*) y antígenos específicos de tumor (TSA, *tumor-specific*

antigens). Los TAA corresponden a antígenos de diferenciación a causa de cambios epigenéticos y de la sobreexpresión de proteínas no mutadas; mientras que los TSA de proteínas de virus oncogénicos y neoantígenos derivados de mutaciones. Seguido del procesamiento hasta péptidos son presentados en el contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MCH, por sus siglas en inglés *major histocompatibility complex*) a los linfocitos; sobre MCH clase I para CD8+ y MCH clase II para CD4+. De esta manera, interaccionara con el péptido aquellos linfocitos T *naïve* que exhiban en su superficie un receptor de células T (TCR por sus siglas en inglés, *T cell receptor*) específico para este. Junto a esta primera señal dada por la interacción específica complejo MCH-péptido-TCR, se requiere un segunda señal provista por moléculas co-estimuladoras para lograr la activación de la célula T. Esta acción se consigue a través del receptor CD28 expresado constitutivamente sobre las células T *naïve* y la unión a su ligando B7 (CD80 o CD86) expresado en la superficie de las células presentadoras de antígeno (figura 3). Una tercera señal es generada por la secreción de citoquinas que promueven la expansión de las células T activadas (Coulie et al.,2014).

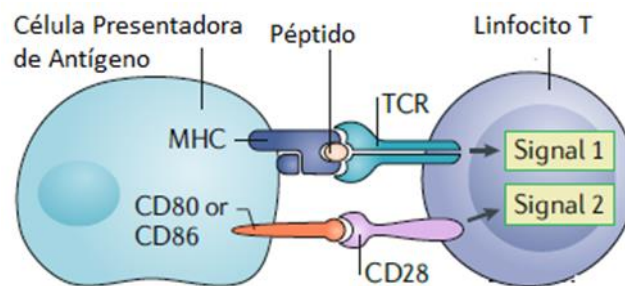


Figura 3. Presentación antigénica. Representación de la señal 1 (Interacción MHC-péptido-TCR) y señal 2 (coestimulación CD80/86-CD28) (Adaptado de Havel et al., 2019).

Este proceso ocurre en forma cíclica a través del ciclo cáncer-inmunidad como se verá a continuación.

1.2.2. Ciclo cáncer- inmunidad

El ciclo consiste básicamente en siete pasos claves, donde la acción de los linfocitos T citotóxicos presenta un rol fundamental. Posterior a la captación, procesamiento y presentación antigénica en las MHC (pasos 1 y 2), las células presentadoras migran a un ganglio linfático próximo, donde interaccionaran con las células T *naïve* específicas (paso 3). Posteriormente, los linfocitos T activados efectores migran al sitio donde se encuentran las células tumorales (paso 4). Una vez que las células T infiltran el tumor (paso 5), necesitan “reestimularse”, al reconocer por medio del TCR el antígeno ahora presentado en las MHC I en la superficie de la célula tumoral, además de las señales coestimuladoras (paso 6), para finalmente atacar a la célula tumoral con la liberación de perforina y granzima B (paso7) (Chen y Mellman,2013) (figura 4). El rol de los linfocitos CD4+ consiste en secretar citoquinas que promuevan el desarrollo de linfocitos CD8 + eficaces y el aumento de expresión MHC I en la célula tumoral por medio TNF e IFN - γ (Abbas et al., 2012 a).

No obstante, este ciclo no es completamente efectivo, debido a que existen mecanismos en cada uno de los pasos que conllevan a que el tumor evada la acción del sistema inmune (Kim y Chen,2016).

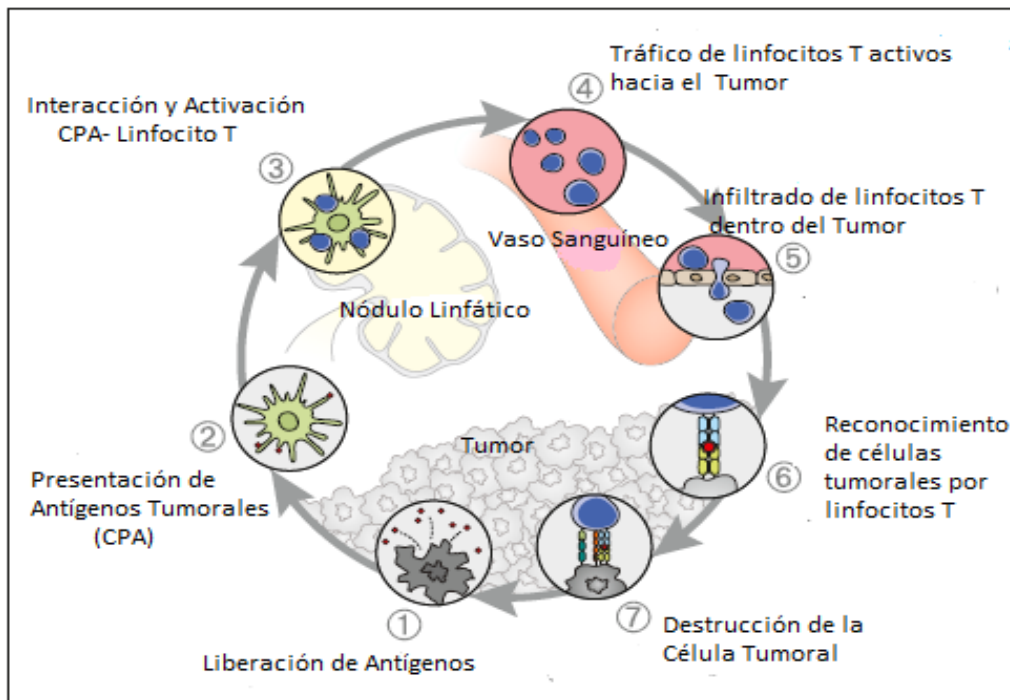


Figura 4. Ciclo cáncer-inmunidad Representación de los pasos implicados en el reconocimiento y eliminación de las células tumorales. Adaptado de (Chen y Mellman,2013).

1.2.3. Inmunoección del cáncer

El control del desarrollo tumoral mediante la acción del sistema inmune tanto innato como adaptativo, que en un primer momento logran eliminar las células tumorales, se denomina inmunovigilancia. Sin embargo, tras una destrucción incompleta del tumor, tiene lugar una fase de equilibrio. En consecuencia, si las células tumorales adquieren capacidad para superar las restricciones de la fase anterior, evadiendo al sistema inmune, se produce la fase de escape. Este proceso conformado por las tres fases (las tres E): Eliminación, Equilibrio y Escape, es denominado inmunoección del cáncer (figura 5).

En la evasión del sistema inmune, además de los fallos del ciclo cáncer-inmunidad, participan los componentes inmunosupresores del microambiente tumoral. Entre las células con potencial inmunosupresor se encuentran los TAM de tipo M2, las células mieloides supresoras y un subgrupo de linfocitos T CD4 +, los T reguladores (T regs). La acción de estas células es llevada a cabo por contacto directo con otras células, por la secreción de citoquinas inhibitorias como TGF- β y IL-10, y expresión de ciertas moléculas inhibitorias (Dunn et al.,2004). La acción de las moléculas inhibitorias se detallará a continuación.

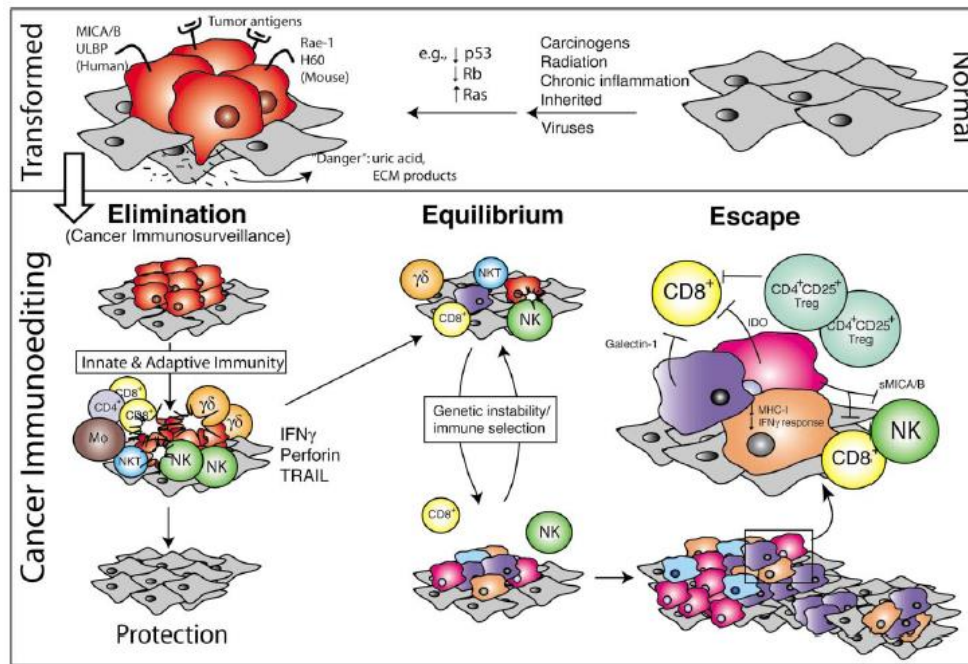


Figura 5. Fases del proceso de inmunoedición en cáncer. (Dunn et al., 2004)

1.2.4. Puntos de control inmune

Fisiológicamente, la respuesta inmune es controlada para que no se produzca una reacción exacerbada que pueda afectar al tejido sano o causar enfermedades autoinmunes. Para ello, existen puntos de control inmune (ICP, *immune check point*), donde moléculas inhibitorias consiguen frenar la activación de las células T (Chen y Flies, 2013).

La primer molécula implicada en este proceso es el receptor CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte associated- antigen 4*). Presenta cierta homología estructural con el coestimulador CD28 y compite con su ligando B7, pero con una mayor afinidad. Su expresión es inducida en las células T tras su activación (Rudd et al., 2009).

Posteriormente, se descubrió el receptor PD-1 (*programmed cell death protein 1*), y sus ligandos, PD-L1 y PD-L2. PD-1 es expresado en células T, células B, *natural killer*, monocitos activados y células dendríticas. Consiste en una glicoproteína transmembrana tipo I, cuyo dominio extracelular presenta homología a CTLA-4, CD28 e ICOS (coestimulador de células T inducible). En el dominio intracelular se encuentran motivos con capacidad inhibitoria como son ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) y ITSM (*immunoreceptor tyrosine-based switch motif*). Tras la unión del receptor al ligando, estos motivos son autofosforilados en los residuos de tirosina, permitiendo el reclutamiento de fosfatasa de tirosinas (PTPs), como SHP2. Estas fosfatasa son encargadas de desfosforilar varias quinasas de señalización claves, generadas por la coestimulación de TCR y CD28, y así, contrarrestar los eventos de activación en la célula T (figura 6). En cuanto a los ligandos, PD-L1 es expresado en varios tipos celulares, tanto en células hematopoyéticas (células T, células B, células dendríticas y macrófagos), como en no hematopoyéticas (células endoteliales y epiteliales). En cambio, PD-L2 es expresado a un nivel más bajo y principalmente en células dendríticas, macrófagos y células B (Wu et al., 2019).

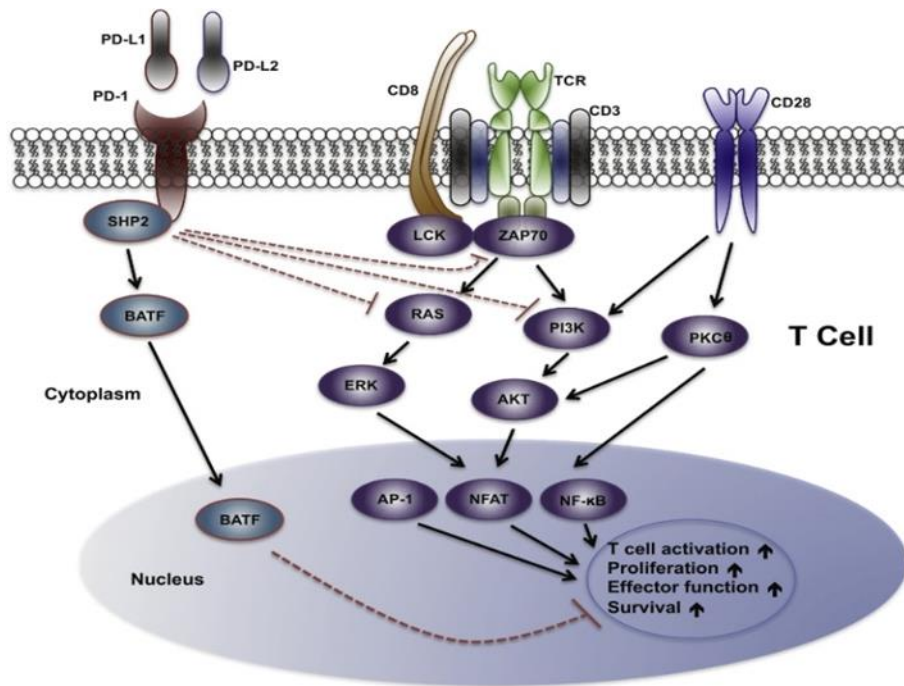


Figura 6 . Vías de señalización tras la unión del ligando PD-L1/2 al receptor PD- 1 en la célula T. Las señales positivas dirigidas al núcleo por la activación de los receptores TCR y CD28 resultan inhibidas y como consecuencia, disminuye la activación, proliferación, función efectora y supervivencia de las células T (Wu et al.,2019).

De este modo, la supresión de las células T es obtenida en principio por la acción temprana de CTLA-4 en los nódulos linfáticos, y más tarde, a nivel de los tejidos periféricos por medio de PD-1 (Wu et al., 2019).

Se observó que las células tumorales expresan PD-L1, de esta forma, crean una estrategia para evadir la respuesta inmune, ya que inactivan la citotoxicidad mediada por las células T, permitiendo la progresión tumoral y el desarrollo de metástasis (Dong et al.,2002).

En base a estos mecanismos se han desarrollado estrategias terapéuticas que son empleadas para el tratamiento del cáncer de pulmón, uno de los tumores con mayor incidencia y mortalidad a nivel global, que se explicarán en detalle en el apartado correspondiente a tratamientos.

1.3. CÁNCER DE PULMÓN

1.3.1. Epidemiología

El cáncer es la primer causa de mortalidad en los países desarrollados, seguido de las enfermedades cardiovasculares (Dagenais et al.,2020).

A nivel mundial, se han registrado en el año 2018, 18.1 millones de casos nuevos de cáncer y 9.6 millones de muertes por cáncer, considerando ambos sexos y todas las edades. Actualmente, el cáncer de pulmón presenta la mayor incidencia y es la principal causa de muerte por cáncer, en ambos sexos. En hombres, el cáncer de pulmón presenta la mayor incidencia (14,5%) y mortalidad (22%); le siguen en incidencia cáncer de próstata (13,5%) y colorrectal (10,9%) y en mortalidad, cáncer de hígado (10,2%) y estómago (9,5%). Mientras que, en mujeres, la mayor incidencia y mortalidad se deben al cáncer de mama (24,2% y 15%, respectivamente); le siguen en incidencia cáncer colorrectal (9,5%) y pulmón (8,4%) y, en mortalidad, cáncer de pulmón (13,8%) y colorrectal (9,5%) (Bray et al.,2018).

En España, en el año 2018, el número de casos nuevos de cáncer diagnosticados se estimó en 270.363. En ambos sexos, los cuatro tipos de cáncer más frecuentes fueron: colorrectal (14% del total), próstata (12%), mama (12%) y pulmón (10%). Sin embargo, de los 113.584 fallecidos a causa de cáncer, el cáncer de pulmón presentó la mayor tasa de mortalidad, con un total de 21.200 fallecimientos (Globocan,2020).

1.3.2. Factores de riesgo

El principal factor de riesgo para desarrollar cáncer de pulmón es el consumo de tabaco. El humo de tabaco presenta 4000 compuestos químicos, 60 con poder carcinogénico, siendo los más significativos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, nitratos y N-nitrosaminas. Por lo cual, existe una relación directa entre el número de cigarrillos fumados y el riesgo de desarrollar la enfermedad (De Groot y Munden,2012). Sin embargo, muchos casos ocurren en pacientes que nunca han sido fumadores. Por lo tanto, otros factores etiológicos se deben considerar como, la exposición involuntaria al humo de tabaco, la exposición ambiental y ocupacional a radón, exposición a asbestos, la contaminación ambiental, las enfermedades respiratorias preexistentes, la edad y la susceptibilidad genética (Couraud et al., 2012).

1.3.3. Diagnóstico

La evaluación clínica se inicia ante la presencia de manifestaciones clínicas tales como tos, dolor de pecho, hemoptisis, pérdida de peso y disnea. Por lo tanto, es imprescindible el empleo de una técnica por imagen para determinar el tamaño y forma de las lesiones, la localización y la relación con las estructuras circundantes. Asimismo, detectar invasiones linfonodales o metástasis. Además, se debe obtener una muestra del tumor para la confirmación histopatológica (Gridelli et al.,2015).

1.3.4. Estadificación y pronóstico

La estadificación se basa principalmente en el sistema TNM, el cual describe la extensión anatómica de los tumores en términos de 3 componentes: tamaño del tumor primario (T), ausencia o presencia y extensión de metástasis en ganglios linfáticos regionales (N), y metástasis a órganos distantes (M). La clasificación TNM 8ª edición es la actualmente vigente (tabla suplementaria 1). La combinación de los tres componentes define los estadios de la enfermedad, orientando de esta manera al tratamiento y al pronóstico. Los estadios en orden creciente de extensión de la enfermedad son: Estadio 0; IA1, IA2, IA3, IB; IIA, IIB; IIIA, IIIB, IIIC; IVA, IVB (Detterbeck et al, 2017) (tabla suplementaria 2).

Si bien esta categorización provee de importante información pronóstica, existen otros factores que pueden influir en el desarrollo clínico de la enfermedad, tales como: estado general de salud (*performance status*, o ECOG), sexo, tipo histológico o estado nutricional (Goldstraw et al., 2011).

Debido a la presencia tardía de los síntomas, el 70% de los pacientes se encuentran en estadios avanzados de la enfermedad al momento del diagnóstico, presentando una supervivencia global a los 5 años inferior al 15 % (Goldstraw et al., 2011).

1.3.5. Clasificación

El cáncer de pulmón se clasifica histopatológicamente, a partir de una muestra tumoral, en los siguientes tipos (figura 7):

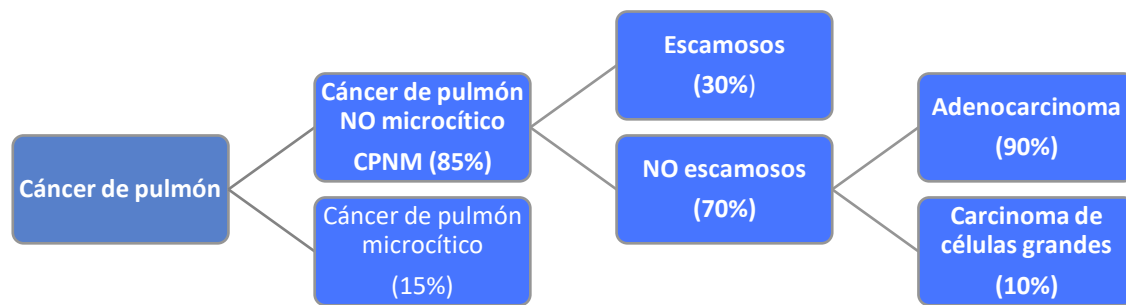


Figura 7. Clasificación histológica de cáncer de pulmón. (Adaptación de Travis,2020).

Actualmente, también se implementa el análisis molecular para hallar las mutaciones presentes en un determinado tipo histológico, siendo de gran utilidad para una terapia dirigida y la inclusión de pacientes en los ensayos clínicos. El perfil genético en adenocarcinomas se caracteriza por mutaciones en *KRAS*, *EGFR*, *BRAF* y fusiones de *ALK*, *ROS1* y *RET*, mientras que en carcinomas de células escamosas se observan alteraciones en *FGFR1*, *CDKN2A*, *MET*, *PIK3CA* y *PTEN* (Testa et al.,2018).

1.3.6. Tratamiento

El CPNM es una enfermedad heterogénea, por ende, el tratamiento debe ser personalizado en base al estado clínico del paciente, estadio de la enfermedad, tipo histológico y perfil molecular.

Para los estadios iniciales, resecables, el tratamiento de elección es la extirpación quirúrgica completa del tumor, aunque algunos pacientes pueden desarrollar recurrencias. En el caso de los pacientes con CPNM no resecable localmente avanzado, la mejor opción es la quimioradioterapia concurrente comparado con la secuencial (Gridelli et al.,2015).

Para los estadios avanzados, en presencia de mutaciones en oncogenes *drivers*, la terapia molecular dirigida es la primer línea de tratamiento. La FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) ha aprobado el uso de inhibidores de tirosina quinasa (TKI) para mutaciones en *EGFR* (Erlotinib, Gefitinib, Afatinib y Osimertinib); *BRAF* (Dabrafenib/Trametinib); reordenamientos en *ALK* (Crizotinib, Alectinib y Ceritinib), *NTRK/ROS1* (Entrectinib), fusiones de *RET* (Selpercatinib) y amplificación de *MET* (Crizotinib). En ausencia de las mutaciones mencionadas, se enfoca en regímenes de quimioterapia basada en platino en combinación con paclitaxel, gemcitabina, docetaxel o vinorelbina o el empleo de la inmunoterapia (Ettinger et al., 2018).

El paradigma del tratamiento del cáncer de pulmón está en constante revisión y, sin duda, las terapias de base inmunológica son actualmente la opción con mejores resultados para tratar a pacientes sin mutaciones en genes *drivers*, dichas terapias que se comentarán en detalle en los siguientes apartados.

1.4. INMUNOTERAPIA: BLOQUEANTES DE LOS PUNTOS DE CONTROL INMUNE

Gracias a la dilucidación de los mecanismos de puntos de control inmune, se desarrollaron anticuerpos monoclonales contra CTLA-4 y otros dirigidos al eje PD-1/ PD-L1, para bloquear su acción, reestableciendo la inmunidad antitumoral mediada por células T. Estos hallazgos dieron lugar a un nuevo campo en el tratamiento contra el cáncer conocido como bloqueantes de los puntos de control inmune (*immune checkpoint blockers*, ICB). De esta manera, la estrategia de tratamiento paso de estar

dirigida a las células tumorales a focalizarse en la reactivación del sistema inmune (figura 8) (Ribas,2012).

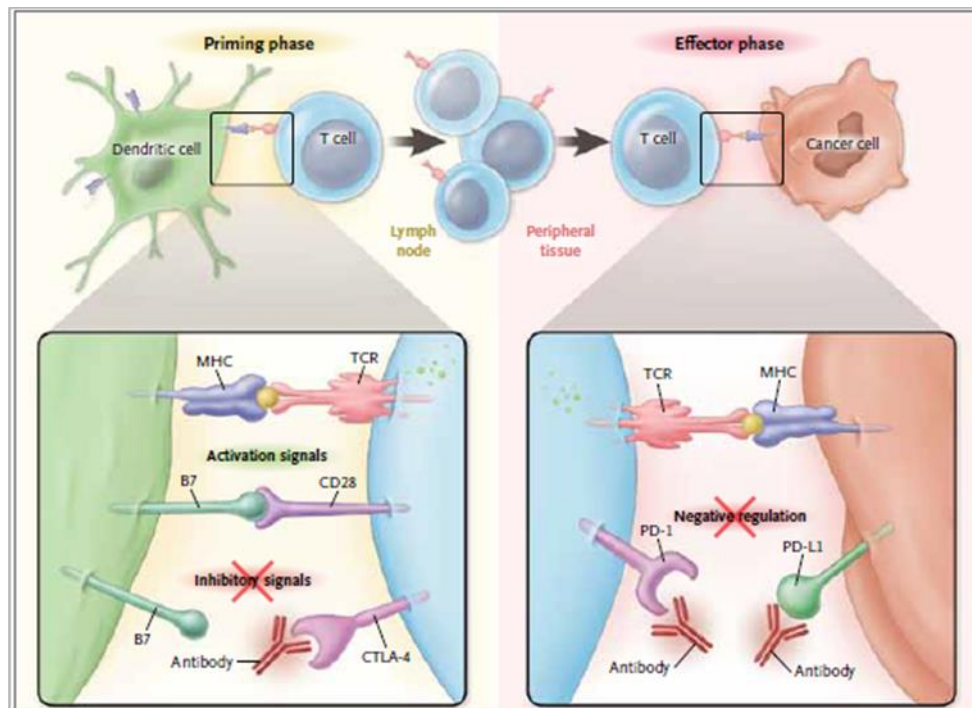


Figura 8. Inmunoterapia: bloqueantes de los puntos de control inmune. Anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 a nivel de nódulo linfático y anti-PD-1/PD-L1 en el tejido periférico (Ribas,2012).

El primer anticuerpo monoclonal desarrollado fue contra CTLA-4, Ipilimumab, para el tratamiento de pacientes con melanoma metastásico, presentando mejoras en las tasas de supervivencia global, pero con alto grado de eventos adversos (Hodi et al.,2010).

Posteriormente, surgieron anticuerpos monoclonales completamente humanizados que bloquean la interacción PD-1/PD-L1. La FDA, a raíz del éxito de varios ensayos clínicos de fase II y III, ha aprobado el uso de los siguientes anticuerpos para el tratamiento de CPNM: Nivolumab y Pembrolizumab, (anti-PD1) y, Atezolizumab y Durvalumab (anti-PD-L1).

Nivolumab en comparación con docetaxel, ha mostrado una tasa de supervivencia global al año de 51% (IC 95%, 45 a 56) versus 39% (IC 95%,33 a 45) en CPNM no escamoso y de 42% (IC 95%,34 a 50) versus 24% (IC 95%, 17 a 31) en CPNM escamoso. En cuanto a Pembrolizumab en comparación con docetaxel ha mostrado una supervivencia global al año de 43,2% versus 34,6% a la dosis aprobada de 2 mg / kg en CPNM con PD-L1 en 1% o más de células tumorales. Con respecto Atezolizumab y Durvalumab, también mostraron una mayor supervivencia global en comparación con la quimioterapia (Wu et al.,2019).

El bloqueo PD-1/PDL-1 presenta un efecto más específico sobre las células T antitumorales, produciendo menos toxicidad comparado con el bloqueo de CTLA-4 (Ribas,2012).

Sin embargo, hay un elevado número de pacientes que no se beneficia del tratamiento (resistencia primaria), mientras que otros, tras un periodo de respuesta, presentan recaída y progresión de la enfermedad (resistencia adquirida). Los mecanismos implicados en la resistencia a ICB consisten en factores intrínsecos y extrínsecos al tumor. Dentro de los intrínsecos se incluyen: pérdida de expresión de antígenos tumorales, alteración en la maquinaria de procesamiento y presentación antigénica, y

alteraciones en vías de señalización (*MAPK, PI3K, WNT*). En cuanto a los factores extrínsecos, son los vinculados al microambiente tumoral: aumento de células T reguladoras, macrófagos M2, *MDSCs*, expresión de moléculas inhibitorias adicionales (*VISTA, LAG-3, TIM-3*), ausencia de células T, entre otros (Sharma et al.,2017).

Como consecuencia a esta heterogeneidad en las respuestas, es necesario identificar biomarcadores predictivos de respuesta a los ICB, para enfocarnos en una medicina de precisión y personalizada. De esta forma, se pretende “seleccionar” aquellos pacientes que se beneficiarán de la terapia y así, maximizar el control efectivo de la enfermedad, reducir los eventos adversos (toxicidad asociada a la terapia) y minimizar los costos. Los biomarcadores vigentes y en estudio se explicarán a continuación.

1.5. BIOMARCADORES

Un biomarcador predictivo es una característica que puede ser objetivamente medible y evaluable como un indicador del efecto de un fármaco sobre la evolución del tumor.

El uso de un biomarcador estático, evaluado solamente previo al inicio del tratamiento, no resulta del todo efectivo debido a que las características del tumor (cambios moleculares y fenotípicos) y la respuesta inmune varía en el transcurso de la enfermedad y el tratamiento. En cambio, los biomarcadores dinámicos permiten conocer las variaciones que surgen durante el tratamiento, predecir la respuesta y tomar decisiones de forma eficaz (Lesterhuis et al.,2017). Asimismo, dada la heterogeneidad tumoral y la dificultad de obtener muestras de tejido tumoral en los pacientes en estadios avanzados, es necesario recurrir a nuevas estrategias. La biopsia líquida, como la sangre periférica, permite la obtención de muestras seriadas de forma mínimamente invasiva y es una muestra representativa del tejido tumoral, ya que células tumorales, ácidos nucleicos, metabolitos, células inmunes infiltrantes del tumor, entre otros son vertidos a la circulación general (Heitzer et al.,2019).

1.5.1. Situación actual

Actualmente, la FDA aprueba para uso clínico, la determinación de la expresión PD-L1 en tejido tumoral mediante ensayos de inmunohistoquímica. El grado de expresión de PD-L1 se correlaciona con una respuesta objetiva a ICB. No obstante, hay evidencias que pacientes con CPNM, con niveles bajos o indetectables de PD-L1, experimentan beneficios clínicos durables a causa de la terapia (Gibney et al.,2016).

Estas discrepancias pueden deberse a varios factores, entre ellos: la expresión dinámica de PD-L1 y su heterogeneidad intratumoral, la variabilidad de los ensayos de inmunohistoquímica disponibles y la falta de estandarización en el valor de corte para determinar positividad (Patel y Kurzrock,2015). Por lo expuesto, la inmunohistoquímica para PD-L1 por sí sola, no es un biomarcador efectivo para predecir la respuesta a ICB.

Por otro lado, la carga mutacional tumoral (TMB por sus siglas en inglés, *tumor mutation burden*) definida como el número de mutaciones somáticas con cambio de sentido presentes en la muestra tumoral, se correlaciona significativamente con la respuesta a ICB. A mayor TMB, mayor es la tasa de respuesta objetiva al tratamiento. La FDA aprueba para su determinación la secuenciación por NGS (*next generation sequencing*) de paneles de genes seleccionados. Sin embargo, aún no están estandarizados los valores de corte para definir si la carga mutacional es alta o baja (Wang et al.,2019).

También existe evidencia que los tumores que presentan mutaciones en genes que codifican para proteínas involucradas en la reparación del DNA, como los errores de mal apareamiento *dMMR*

(*deficient Mismatch Repair*), generan mutaciones en regiones de secuencias cortas y repetitivas, llamadas microsatélites. Se denominan tumores de alta inestabilidad de microsatélite *MSI-H* (*Microsatellite instability-high*) y responden favorablemente a ICB. Por lo tanto, la FDA aprueba el empleo de ICB (Pembrolizumab) en tumores sólidos con *dMMR* y *MSI-H*. Esto es debido a que los tumores con *dMMR* y *MSI-H* tienen mayor TMB (Marcus et al.,2019).

En base a las limitaciones que presentan los biomarcadores existentes, continúa la búsqueda de nuevos biomarcadores.

1.5.2. Nuevas aproximaciones

Existen otros biomarcadores que podrían tener una gran relevancia, entre los que cabe destacar: el grado de infiltración linfocitaria intratumoral, la composición de la microbiota intestinal, la carga neoantigénica tumoral y el repertorio TCR (Havel et al., 2019).

En base a la infiltración linfocitaria intratumoral, los tumores que presentan un fenotipo inmune-inflamado, con alto grado de células T, están asociados a mejores respuestas. Lo opuesto sucede en los tumores con fenotipos inmune-excluido e inmune-desiertos, debido a que los linfocitos permanecen en la periferia del tumor, o directamente están ausentes, respectivamente. También es importante el tipo de linfocitos que componen el infiltrado (Gibney et al.,2016).

En cuanto a la microbiota, se ha encontrado asociación entre una determinada composición de especies microbianas y una respuesta efectiva. Además, el incremento en la diversidad, sin tener en cuenta la identidad de especies, también fue correlacionada con mejores beneficios (revisado por Havel et al.,2019).

La carga neoantigénica tumoral surge a raíz de que mutaciones no sinónimas de nucleótido único y de pequeñas inserciones o deleciones (indel) que causan un cambio en el marco de lectura, codifican para nuevos péptidos específicos del tumor. Estos neoantígenos, deben ser inmunogénicos, es decir, deben poder presentarse en el contexto de las MHC y ser reconocidos por los TCR de las células T, para generar una respuesta inmune específica contra el tumor. Actualmente, la carga neoantigénica se estima en base a la carga mutacional tumoral (Chen y Mellman,2017).

Cada TCR sobre una célula T es único, por lo tanto, la población de linfocitos implicada en controlar el desarrollo tumoral presenta su propio repertorio TCR, y determina si los neoantígenos presentados en las células tumorales van a ser reconocidos por el sistema inmune. Además, dado que los linfocitos efectores son “reactivados” por la acción de los ICB, el análisis del repertorio TCR permitiría comprender la respuesta al tratamiento (Attaf et al.,2015).

Entre todos los biomarcadores presentados, este trabajo se basa en estudiar el repertorio de TCR de linfocitos presentes en sangre periférica.

Gracias a las técnicas de secuenciación de última generación disponibles es posible conocer la identidad de todos los TCR presentes en una muestra, secuenciando la región génica de mayor variabilidad, la cual codifica para el dominio que interacciona con el péptido antigénico. El repertorio TCR, por lo tanto, es determinado por el conjunto de secuencias de TCR en un individuo (Aversa et al., 2020)

1.6. TCR

El TCR es el receptor presente en la membrana de linfocitos T cooperadores y T citotóxicos que reconoce péptidos antigénicos restringidos por el MHC. Está formado por dos cadenas polipeptídicas transmembranas diferentes (α/β o γ/δ), unidas entre sí por un enlace disulfuro. Cada cadena, presenta un dominio variable (V) y un dominio constante (C) del tipo inmunoglobulina (figura 9). Debido a su

corta cola citoplasmática, no presentan mecanismos de transducción de señales, por lo tanto, se asocia de forma no covalente a las proteínas CD3 y ζ (CD247) que tienen dominios tirosina quinasa. Cerca del 95 % de los linfocitos circulantes presentan receptores del tipo α/β , los restantes se encuentran en tejidos epiteliales y son del tipo γ/δ (Abbas et al.,2012b).

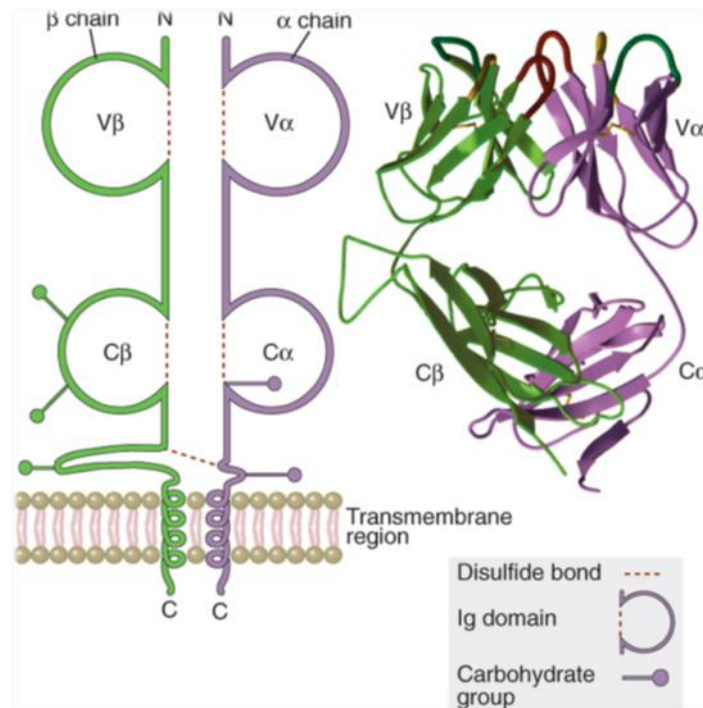


Figura 9. Estructura del receptor de TCR α/β (Abbas et al.,2012b).

En la región variable de ambas cadenas, hay secuencias cortas de aminoácidos, donde se concentra la mayor variabilidad entre los diferentes TCR. Estas secuencias son las regiones determinantes de complementariedad (CDR por su sigla en inglés, *complementarity-determining regions*). Por cada cadena, hay tres CDR, CDR1 y CDR2 que reconocen al MHC, mientras que CDR3 presenta la mayor variabilidad y, por lo tanto, interacciona con el antígeno (Abbas et al.,2012b).

Cada cadena del TCR, está codificada por una gran cantidad de segmentos génicos que sufren un proceso de recombinación somática durante la maduración de los linfocitos T en el timo. En el DNA de línea germinal, el locus de la cadena α , en el cromosoma 14, está compuesto por aproximadamente 45 segmentos V (variables) y 55 segmentos J (unión), que codifican para el dominio variable y un gen C para el dominio constante. Mientras que el locus que codifica para la cadena β , en el cromosoma 7, comprende aproximadamente 60 segmentos V, 2 segmentos D (diversidad) y 14 segmentos J, para el dominio variable y dos genes para el constante.

El proceso de recombinación V(D)J consiste en la selección aleatoria de un segmento de cada clase, uniéndose entre sí para formar el gen V(D)J que codificará para el dominio variable. Mediante un proceso de corte y empalme se une un segmento C para el dominio constante (figura10) (Attaf et al., 2015).

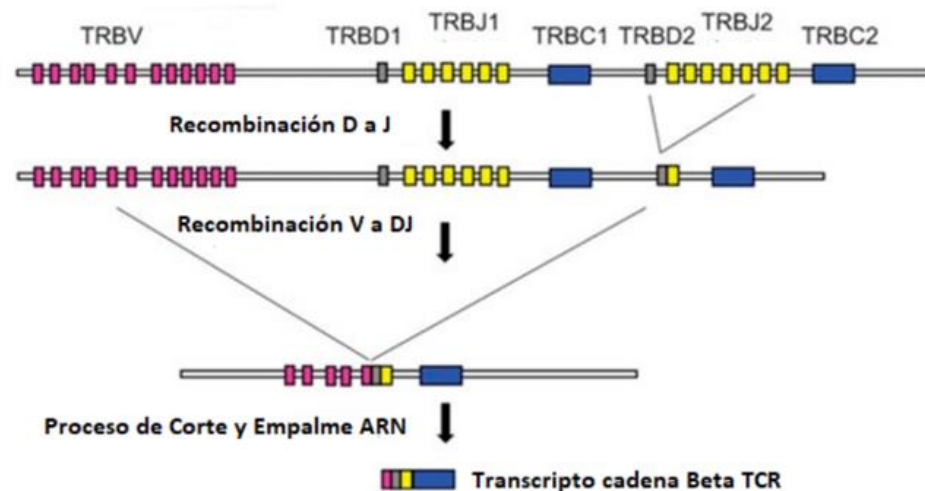


Figura 10. Recombinación VDJ en el locus de la cadena β . Primero, se observa la recombinación de segmentos D y J. Luego, la recombinación del segmento DJ con un segmento V para obtener el segmento VDJ. Tras un proceso de corte y empalme, añadiendo el gen C, se consigue el transcrito que codifica para la cadena β del TCR (Adaptado de Attaf et al., 2015).

Este mecanismo requiere del complejo endonucleasa Rag-1/Rag-2, que reconoce secuencias señal de recombinación RSS (*recombination signal sequences*) que se encuentran adyacentes a los segmentos. Las RSS son secuencias de nucleótidos conservadas, un heptámero y un nonámero. Tras la "sinapsis" de los segmentos seleccionados, se produce la escisión de la doble hebra para liberar la secuencia entre estos segmentos codificadores. La ruptura de la doble hebra activa la vía de reparación del DNA por recombinación no homóloga. Es reclutada la endonucleasa Artemisa, que abre las horquillas en los extremos codificantes. Si la apertura es asimétrica, se generan extremos cohesivos, donde se incorporan nucleótidos complementarios a la hebra más larga, son los nucleótidos P. En cambio, si la apertura es simétrica, se generan extremos romos, que mediante la enzima desoxinucleotidil terminal-transferasa (TdT), incorpora hasta 20 nucleótidos aleatorios, son los nucleótidos N. Además, la acción de Artemisa puede eliminar nucleótidos. De esta manera, previo a la unión de los segmentos, se produce diversidad entre las uniones de V y D, D y J (para la cadena β) o V y J (para la cadena α) (Abbas et al., 2012c).

Por lo tanto, la gran diversidad de repertorios de TCR que permiten el reconocimiento de un amplio espectro de antígenos, viene determinada por la diversidad combinatoria de los múltiples segmentos, la yuxtaposición de dos dominios variables, $V\alpha$ y $V\beta$, y de la diversidad de unión. Sin embargo, este repertorio disminuye tras los procesos de selección positiva y negativa en el timo (Attaf et al., 2015).

Debido a que los TCR α/β son los más abundantes en circulación y dado que la cadena β presenta un segmento extra de diversidad (D), la secuenciación de la región CDR3 β codificada por el extremo final del segmento V, el segmento D, el segmento J, y las mutaciones entre las uniones, permite una mejor discriminación del TCR (figura 11) (Aversa et al., 2020).

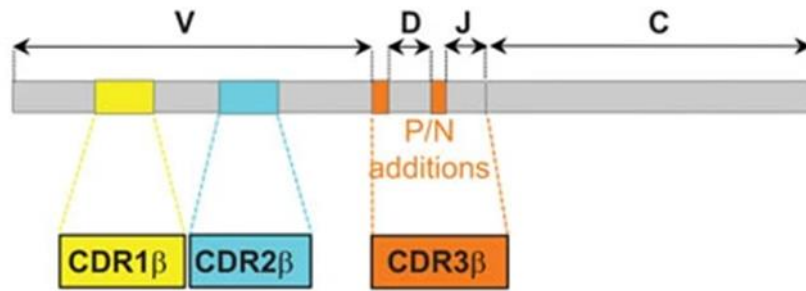


Figura 11. Estructura génica de la región CDR3 β . La caja color naranja representa la región CDR3 β , compuesta por el extremo final del segmento V, el segmento D, el segmento J y las mutaciones en la unión de los segmentos (Adaptado de Attaf et al., 2015).

Por lo comentado en los apartados anteriores, el análisis del repertorio TCR podría ser un biomarcador interesante para seleccionar pacientes que se beneficiarían del uso de ICB. Actualmente existen escasos datos sobre el posible valor como biomarcador del análisis del repertorio de TCR en CPNM, a lo que se suma la heterogeneidad de metodologías utilizadas para su evaluación y las diferencias encontradas en los estudios realizados en muestras de tejido comparados con los de sangre periférica. Por lo tanto, es necesario ampliar y reforzar el conocimiento en esta área para poder emplear el repertorio TCR como un biomarcador de respuesta a ICB.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es caracterizar el repertorio de receptores de linfocitos T de sangre periférica en una cohorte de pacientes con CPNM en estadios avanzados (IIIB- IV) tratados con bloqueantes de la vía PD1/PD-L1, para la implementación de biomarcadores inmuno-oncológicos predictivos.

Objetivos específicos:

1. Analizar el repertorio de TCRs en linfocitos de sangre periférica mediante secuenciación de nueva generación en una cohorte de pacientes tratados con inmunoterapia.
2. Determinar las características del repertorio de TCRs a través de la identificación de clonotipos individuales y de diferentes índices que valoran su riqueza y diversidad (índice de Shannon, clonalidad, convergencia).
3. Correlacionar las características del repertorio de TCRs con variables clínico-patológicas de la población de pacientes incluidos en el estudio.
4. Relacionar la composición e índices del repertorio de células T con variables pronósticas (tiempo a la progresión y supervivencia global) en la cohorte de pacientes tratados con inmunoterapia.
5. Evaluar la dinámica del repertorio de TCRs en la respuesta a la terapia inmune.
6. Integrar los resultados sobre la contribución de diferentes poblaciones de linfocitos T en la respuesta a las inmunoterapias en pacientes con CPNM.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PACIENTES Y MUESTRAS

Se incluyeron 15 pacientes con CPNM en estadios avanzados tratados con un inhibidor anti-PD-1, Pembrolizumab (2mg/kg cada 21 días) en primera línea, en el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia. Se tomaron muestras de sangre periférica antes de iniciar el tratamiento (pretratamiento) y en el momento de la evaluación por imagen, previo al 4º ciclo de Pembrolizumab (post tratamiento). Las características demográficas y clinicopatológicas de los pacientes se obtuvieron de las historias clínicas debidamente anonimizados. La respuesta al tratamiento se evaluó de acuerdo con el criterio de evaluación a respuesta en tumores sólidos (RECIST). El tiempo de supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG), se definen como el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento hasta la fecha de progresión o muerte por la enfermedad, y hasta la muerte, respectivamente. Para aquellos pacientes sin progresión o muerte, la última evaluación registrada se consideró el final del estudio (tablas suplementarias S3 y S4). El estudio se realizó conforme a la declaración de Helsinki de 1975 y los pacientes firmaron un consentimiento informado para participar.

3.2. EXTRACCIÓN DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

Para la obtención de la fracción de células mononucleares se recolectaron 2 tubos de sangre periférica anticoagulado con EDTA. Se emplea una centrifugación en gradiente de densidad para aislarla del resto de los componentes sanguíneos. En primer lugar, se centrifuga a 120 g por 20 minutos y se separa la fracción de plasma enriquecida en plaquetas para otros estudios. Se añade 1,5 ml de tampón fosfato salino (PBS, *phosphate buffered saline*) al tubo con eritrocitos y leucocitos, y se invierte para homogenizar.

En dos tubos cónicos de 15 ml se añade 4 ml de Ficoll-Plaque (GE Healthcare) a cada uno. Se agrega como máximo 5 ml de la suspensión sanguínea con PBS sin disturbar la interfase de Ficoll. Se centrifuga a 400 g por 30 minutos sin freno. La capa de células mononucleares se recoge y lava con PBS centrifugando a 400 g por 5 minutos con freno. Tras descartar el sobrenadante, se resuspende el pellet de células mononucleares con *RNAlater* (Thermo Fisher Scientific) con un volumen dos veces superior, para estabilizar el RNA. Se almacena en microtubos de 1,5 ml a -80º C hasta su posterior procesamiento. Todas las centrifugaciones se realizan a temperatura ambiente (figura 12).

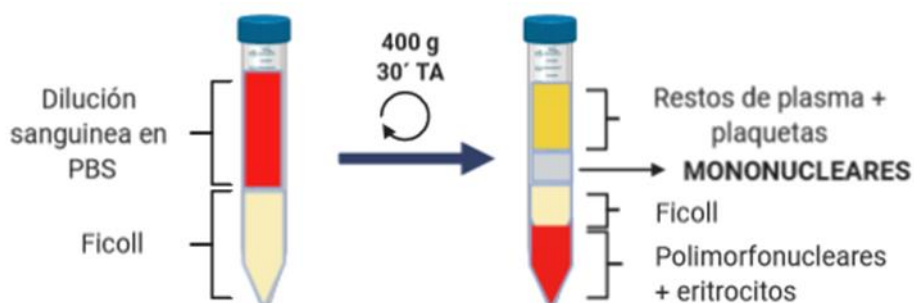


Figura 12. Obtención de células mononucleares con centrifugación en gradiente de densidad. Esquema representativo de las capas celulares separadas tras la centrifugación. En negrita se muestra la capa de células mononucleares utilizada para este estudio.

3.3. RNA

3.3.1. Extracción y purificación de RNA

Para la extracción de RNA de los linfocitos de sangre periférica se utilizó un kit comercial basado en partículas magnéticas, MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific). Los pasos del protocolo incluyen: la lisis de las células con isopropanol y 2-mercaptoetanol; unión del RNA a partículas magnéticas; lavados; tratamiento con DNAsas; segundo paso de unión de RNA a partículas magnéticas y elución de RNA. El protocolo se siguió según las indicaciones del kit.

3.3.2. Cuantificación del RNA extraído

Se cuantificó el RNA extraído utilizando el fluorómetro Qubit (Invitrogen) cuyo principio se caracteriza por el empleo de un fluoróforo que se intercala selectivamente con el RNA. La fluorescencia emitida por el fluoróforo es proporcional a la concentración de RNA. Para la realización de la curva de calibración y la preparación de las muestras se siguieron las indicaciones dadas por el fabricante. Las concentraciones de RNA se expresaron en ng/μl.

3.3.3. Determinación de la integridad del RNA extraído

Debido a que el RNA es inestable y sufre degradaciones gradualmente, es necesario corroborar su integridad antes de continuar con los siguientes pasos. Se utilizó el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies) que, mediante una separación electroforética en microchips, separa el RNA según su tamaño y lo detecta por fluorescencia inducida vía láser. El *software* del instrumento emplea un algoritmo matemático que tiene en cuenta todos los fragmentos observados en el electroferograma y calcula un índice RIN (*RNA Integrity number*). Este índice tiene valores de 1 a 10, siendo 1 el más degradado y 10 el más intacto (Schroeder et al., 2006). Se recomienda el empleo de muestras con RIN igual o superior a 7.

3.3.4. Reacción de retrotranscripción

La reacción de retrotranscripción o transcripción inversa se emplea para transformar el RNA mensajero (RNAm) en una molécula de DNA complementario (DNAc). Se utilizó el kit comercial SuperScript™ IV VILO™ Master Mix (Invitrogen) que contiene cebadores, dNTPs y la enzima transcriptasa inversa en un tampón optimizado. Se siguió el protocolo recomendado en el kit para retrotranscribir 25 ng de RNA total. Se empleó el termociclador™ Veriti Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific).

3.4. SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN CDR3 β DEL TCR

3.4.1. Preparación de librerías

Se utilizó el kit Oncomine™ TCR Beta- SR Assay (Thermo Fisher Scientific) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

El primer paso consiste en la amplificación de la región CDR3 de la cadena β del TCR: se llevó a cabo una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) empleando cebadores que hibridan en el cADN, 59 de ellos con el extremo final del segmento V y 14 con el segmento J, para obtener amplicones de aproximadamente 80 pares de bases, como queda reflejado en la figura 13.

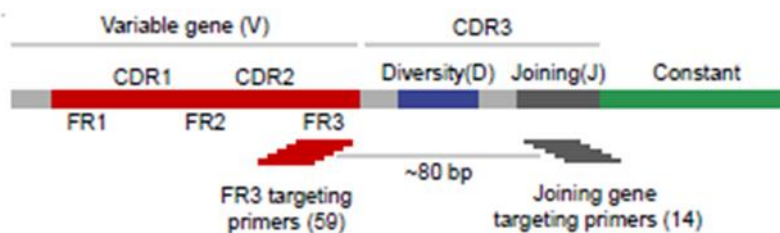


Figura 13. Amplificación de la región CDR3 de la cadena β del TCR. Representación de los 59 cebadores que hibridan con el segmento V y los 14 con el segmento J, para obtener amplicones de aproximadamente 80 pares de bases. (Thermo Fisher Scientific).

Posteriormente se realizó la digestión parcial de los amplicones mediante el reactivo FuPa (Thermo Fisher Scientific) que contiene una enzima que degrada uracilos, una polimerasa con actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ y un anticuerpo que bloquea su acción. Esto permite eliminar el exceso de cebadores y preparar los extremos del amplicón para fijar los adaptadores, código de barras y adaptador P1, con la enzima ligasa. El código de barras consiste en una determinada secuencia de DNA específica y única que identifica a la muestra y así, poder secuenciar varias muestras en una misma carrera. En cambio, el adaptador P1 es igual para todas las muestras y su función es fijar el amplicón a una superficie sólida (figura 14).

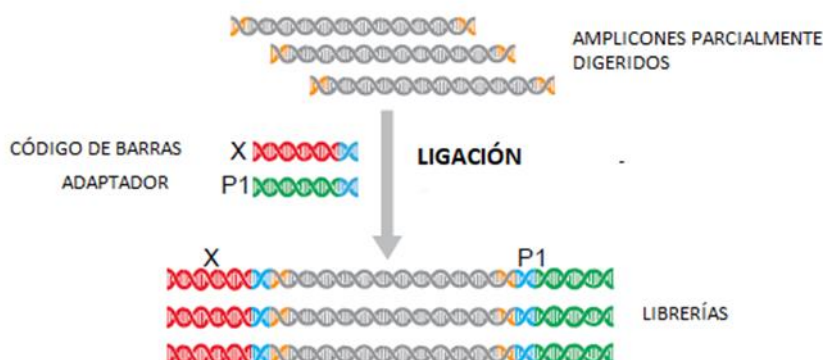


Figura 14. Proceso de ligación de adaptadores. Los adaptadores, código de barras X y adaptador P1 quedan ligados a cada extremo de los amplicones por la acción de la enzima ligasa. (Adaptado de Thermo Fisher Scientific).

Seguidamente, se purificó las librerías utilizando partículas magnéticas provistas por el reactivo Agencourt™ AMPure™ XP (Beckman Coulter, Inc). Los fragmentos de DNA de un determinado número de pares de bases se unen selectivamente a las partículas, usando tampones optimizados. El exceso de cebadores, nucleótidos, sales y enzimas son removidos con lavados. A continuación, se realizó la elución de las librerías purificadas que se mantenían unidas a las partículas magnéticas.

3.4.2. Cuantificación de librerías

Las librerías se cuantificaron utilizando una PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) con el kit Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific). La qPCR emplea una sonda TaqMan para la detección del producto de amplificación conforme se acumula durante la PCR. Esta sonda de oligonucleótidos contiene en el extremo $5'$, un fluoróforo y en el extremo $3'$, un aceptor de fluorescencia (*quencher*). Cuando la sonda está intacta, no se emite fluorescencia ya que esta es captada por el *quencher* mediante la transferencia de energía de resonancia de la fluorescencia (FRET). Por el contrario, al hibridar con la secuencia a amplificar, es hidrolizada por la actividad de $5'-3'$

exonucleasa de la DNA polimerasa Taq que va extendiendo la cadena, liberándose el fluoróforo del *quencher*. La señal fluorescente detectada es proporcional a la cantidad de amplicones producida en cada ciclo (figura 15). Se determina un umbral de fluorescencia, y se registra el número de ciclos necesarios para alcanzar dicho umbral, CT (*cycle threshold*). El CT es inversamente proporcional a la cantidad de copias de DNA iniciales. La concentración se obtiene mediante la interpolación de los CT en una curva de patrones (Heid et al.,1996).

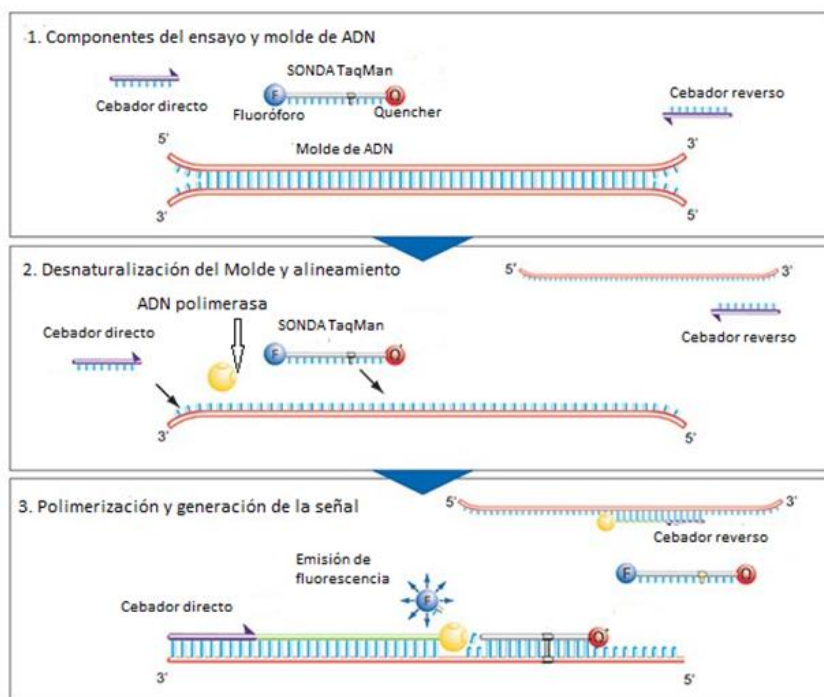


Figura 15. Esquema de PCR con sondas TaqMan® 1: componentes del ensayo y molde de DNA. 2 desnaturalización del molde de DNA y alineamiento de cebadores y sonda. 3. Reacción de polimerización y generación de la señal fluorescente (Adaptado de Thermo Fisher Scientific).

La qPCR se llevó a cabo en el termociclador LightCycler® 480 (Roche), empleando el programa recomendado. Una vez realizada la cuantificación, cada librería se diluyó a una concentración de 25 pM y se combinó con volúmenes iguales para continuar con el siguiente paso.

3.4.3. Preparación del templado

Previo a la secuenciación, cada librería debe amplificarse clonalmente mediante una PCR en emulsión. Se emplean gotas de micelas, donde cada una contiene idealmente los siguientes componentes: una partícula esférica recubierta en su superficie con cebadores que hibridan con el adaptador P1 de las librerías, denominadas ISP (*Ion Sphera Particle*), una copia única de librería y los reactivos necesarios para realizar la PCR. De esta manera, se produce una amplificación de las librerías en la superficie de las ISP. Finalmente se obtienen millones de ISP con miles de copias idénticas de librerías (ISP monoclonales) por cada una (figura 16). Las ISP se depositan en un chip que contiene millones de pocillos, de modo que cada una se aloje dentro de un pocillo (Goodwin et al.,2016).

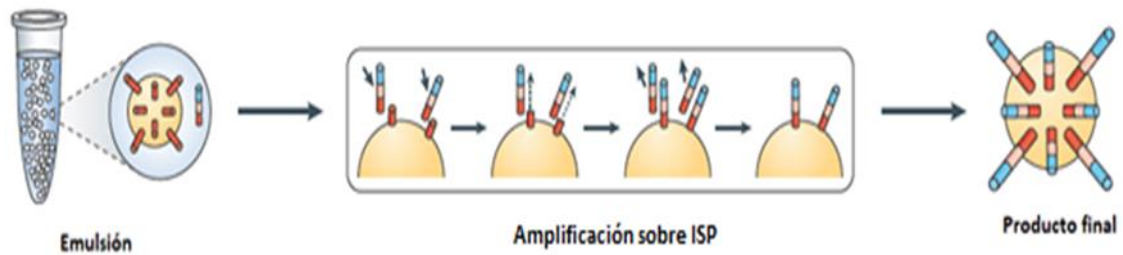


Figura 16. PCR en emulsión. Las esferas (ISP) presentan en su superficie cebadores (rojo) que hibridan con el adaptador P1 de las librerías. Posterior a la amplificación clonal se obtiene el producto final, copias de librerías idénticas sobre las esferas (Adaptado de Goodwin et al.,2016).

Para garantizar que este proceso tenga un buen rendimiento de ISP monoclonales, es necesario una óptima concentración de librería de entrada, ya que una concentración muy baja puede resultar en insuficientes ISP para secuenciar. Por otro lado, una alta concentración condiciona a la mayor obtención de ISP policlonales, es decir, con más de una copia de librería diferentes sobre la ISP.

Este proceso es automatizado en el equipo Ion Chef™ System (Thermo Fisher Scientific), utilizando los reactivos provistos en el kit Ion 510™ & Ion 520™ & Ion 530™ Kit – Chef (Thermo Fisher Scientific). El equipo realiza antes de la carga del chip, un enriquecimiento de ISP amplificadas, monoclonales y policlonales, descartando las ISP “vacías” (sin amplificación en su superficie). Una vez finalizada esta etapa se procede con la secuenciación.

3.4.4. Secuenciación de nueva generación NGS

El secuenciador utilizado es Ion GeneStudio™ S5 System de Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific). Su principio se basa en una secuenciación por síntesis: a medida que la enzima polimerasa incorpora un nucleótido complementario a la cadena de DNA molde, se liberan como subproductos pirofosfato y un ion hidrógeno. Este último genera un cambio de pH en el medio proporcional al número de nucleótidos incorporados. El pH es detectado por un sensor localizado en el fondo de cada pocillo y es convertido a una señal eléctrica (cambio de voltaje) (figura 17). Por lo cual, los nucleótidos se agregan a la reacción en flujos secuenciales para asegurar que solo un nucleótido sea el responsable de la señal. Se realizan lavados entre cada flujo para garantizar que no queden remanentes de nucleótidos (Rothberg et al.,2011).

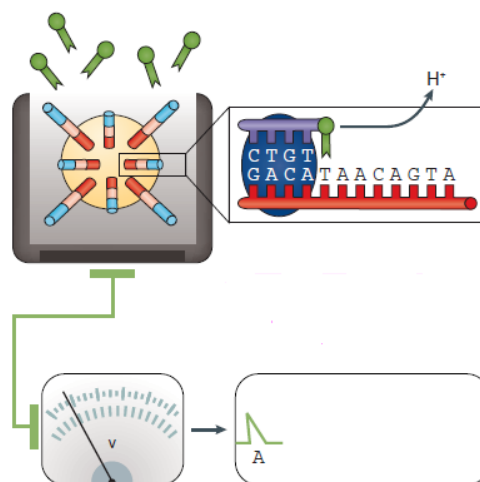


Figura 17. Esquema de secuenciación por síntesis. Se representa un pocillo del chip cargado con una ISP con librerías. Si el nucleótido dispensado (adenina, verde) es complementario al de la cadena molde (timina, rojo), la polimerasa (azul) lo incorporará en la síntesis de la nueva cadena, liberando un ion H⁺ que es registrado por un sensor en el fondo del pocillo (Adaptado Goodwin et al.,2016).

Tabla 1. Métricas de calidad de la carrera de secuenciación.

	MÉTRICAS	VALORES ÓPTIMOS
CLASIFICACIÓN POCILLOS	Carga ISP (%)	90
	Enriquecimiento de ISP con librerías (%)	90-100
FILTROS LIBRERIAS	Policlonalidad (%)	30-40
	Lecturas de baja calidad (%)	12
	Dímero de cebadores (%)	8
LECTURAS FILTRADAS	Lecturas totales útiles	15-20 M
	Lecturas totales útiles (%)	50-60
	Longitud lectura media (pb)	80

Finalmente, las lecturas totales útiles son alineadas con la referencia de la base de datos IMGT® (*International ImMunoGeneTics information system*®) para obtener los reordenamientos VDJ de cada secuencia.

Las lecturas que mapean fuera de la diana o son de baja calidad son eliminadas. Además, se corrige los errores de secuenciación indel y los errores de la PCR. En base a esto las lecturas son clasificadas según se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de las lecturas obtenidas en la secuenciación.

CLASIFICACIÓN LECTURAS	DESCRIPCIÓN
Lecturas productivas	Presentan segmentos V y J, sin codón de parada.
Lecturas productivas rescatadas	Presentan segmentos V y J, sin codón de parada, después de la corrección del error indel.
Lecturas no productivas	Presentan secuencias incorregibles o errores de PCR, no mapean en segmentos V y J, o tienen codón de parada prematuro.
Lecturas fuera de diana/baja calidad	Representan el producto de amplificación fuera de la diana o son lecturas de baja calidad.

Para tener un buen rendimiento de lecturas; las productivas deben ser del 30-50% y considerando las lecturas rescatadas del 50-70%.

3.5. ANÁLISIS DEL REPERTORIO TCR-β

Cada reordenamiento VDJ corresponde a un clonotipo individual. Un clonotipo es una población de linfocitos T que presenta el mismo TCR (igual reordenamiento VDJ) y surge por la expansión de un linfocito luego de activarse. Para cada clonotipo se especifica la secuencia de nucleótidos de la región CDR3 (CDR3NT), la secuencia de aminoácidos (CDR3AA) correspondiente y, los segmentos V (variable) y J (unión) que lo componen. A su vez, se informa la cantidad de lecturas identificadas para ese clonotipo y la frecuencia. La frecuencia de un clonotipo se calcula como el número de lecturas identificadas para el clonotipo / el número de lecturas totales reportadas. Para cada segmento V y J se determina la frecuencia en base a la cantidad de lecturas que mapean con un segmento específico/ el número de lecturas totales reportadas. Además, se obtiene el ratio de frecuencias post tratamiento/ pretratamiento por segmento.

Con el *software* Ion Reporter TM (Thermo Fisher Scientific) se calculan diferentes índices que caracterizan el repertorio TCRβ: riqueza, diversidad, *evenness* y convergencia, que se detallaran a continuación.

La **riqueza**, indica la cantidad de clonotipos diferentes que conforman el repertorio. Se calcula en base al número de secuencias de nucleótidos diferentes presentes, pero no tiene en cuenta la frecuencia de cada una. Por lo tanto, dos muestras pueden tener la misma riqueza, pero diferente distribución.

Para determinar la diversidad clonal se aplican las siguientes fórmulas matemáticas:

➤ **Diversidad Shannon**

Este índice mide la diversidad clonal de un repertorio (ecuación 1).

$$H = - \sum_{i=1}^R p_i \log_2(p_i)$$

Ecuación 1. Fórmula para calcular índice de diversidad Shannon, donde p_i indica la frecuencia de i clonotipo y R (riqueza) es el número total de i clonotipos diferentes (Thermo Fisher Scientific).

Tiene en cuenta la distribución del tamaño clonal (frecuencia). A un índice más alto, el repertorio es más diverso. Sin embargo, un índice más bajo, no solo está afectado por el número de secuencias idénticas (clonotipos) sino que también por su expansión clonal. Por lo tanto, este índice determina la diversidad del repertorio teniendo en cuenta las secuencias únicas (clonotipos) y la distribución del tamaño del clon, sin importar el número total de secuencias. Las muestras que tienen muchos clonotipos de frecuencias similares tendrán un alto índice Shannon (Lee, 2016).

➤ **Evenness:**

Es una medida de la similitud del tamaño de clonotipos. También conocida como la diversidad normalizada de Shannon (ecuación 2).

$$E = \frac{-\sum_{i=1}^R p_i \log_2(p_i)}{\log_2(R)}$$

Ecuación 2. Fórmula para calcular *evenness*, donde p_i indica la frecuencia de un i clonotipo y R indica el número total de clonotipos (Thermo Fisher Scientific).

Tiene un rango que va de 0 a 1. Las muestras compuestas por todos los clonotipos con frecuencias equivalentes, el índice asume el valor uno. Por el contrario, para las muestras con clonotipos de tamaños no equivalentes, como cuando ocurre una expansión clonal, el *evenness* es menor a 1. La **clonalidad** es determinada como: $1 - \text{evenness}$. Cuando el *evenness* es 1, la clonalidad es nula, indicando que no hay clonotipos expandidos.

Convergencia TCR:

Se consideran clonotipos convergentes cuando comparten una secuencia idéntica de aminoácidos en CDR3 (CDR3AA) y un determinado segmento V, pero son codificados por diferentes secuencias de CDR3NT. La convergencia se determina en base a la sumatoria de las frecuencias de los clonotipos que reúnen esas características.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

En primer lugar, se realizaron análisis descriptivos de las características demográficas y clínico-patológicas de la cohorte de pacientes.

En cuanto a las frecuencias de clonotipos y los valores de los índices del repertorio, fueron revisados previo al análisis. Debido a que las variables analíticas no presentan una distribución normal, se utilizaron pruebas no paramétricas.

Las características del repertorio fueron comparadas entre grupos según las características demográficas y clínico-patológicas usando la prueba estadística *Mann-Whitney o Kruskal-Wallis*.

Para determinar si los índices y la composición de los clonotipos tienen valor pronóstico se utilizó la prueba de regresión univariante de Cox. Para las variables con valor pronóstico significativo, la supervivencia se evaluó con las curvas de *Kaplan-Meier*, aplicando la prueba de *log-rank*. Previamente, las variables fueron dicotomizadas empleando la mediana como valor de corte.

Todos los análisis fueron realizados con el *software* de análisis estadístico *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versión 25.0 (Chicago, IL), considerando estadísticamente significativos aquellos análisis donde $p < 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DESCRIPCIÓN DE LA COHORTE DE PACIENTES EN ESTUDIO

En el presente estudio se ha realizado la secuenciación de la región CDR3 del receptor TCR β de linfocitos de sangre periférica, de un total de 15 pacientes con CPNM en estadios avanzados, tratados con anti-PD-1 en primera línea (Pembrolizumab). Los linfocitos fueron aislados de cada paciente de muestras sanguíneas tomadas pretratamiento y post tratamiento. Todos los pacientes presentaron PD-L1% igual o mayor al 50%. Las características demográficas y clínico-patológicas de la cohorte de los pacientes incluidos en el estudio se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Características demográficas y clínico-patológicas de los pacientes

			N	%
Características demográficas	SEXO	Masculino	11	73,3
		Femenino	4	26,7
	EDAD	< 60 años	5	33,3
		≥ 60 años	10	66,7
	HÁBITO TABÁQUICO	Fumador	10	66,7
Nunca y exfumador		5	33,3	
Características clínico-patológicas	ESTADIOS	IIIB	2	13,3
		IVA	3	20,0
		IVB	10	66,7
	HISTOLOGÍA	Adenocarcinoma	13	86,7
		Escamosos-otros	2	13,3
	RESPUESTA	Respuesta parcial (RP)	5	33,3
		Enfermedad estable (EE)	4	26,7
		Progresión enfermedad (PE)	6	40,0
	CRITERIO RESPUESTA	Respondedores (RP)	5	33,3
		No respondedores (EE y PE)	10	66,7
	BENEFICIO CLÍNICO	SI (RP y EE)	9	60,0
		NO (PE)	6	40,0
	EXITUS	SI	1	6,7
NO		14	93,3	

4.2. CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL RNA EXTRAÍDO DE LINFOCITOS

Para la extracción de RNA de los linfocitos aislados con Ficoll se empleó el kit basado en partículas magnéticas (ver Materiales y métodos). La cuantificación se realizó con el fluorómetro Qubit. Las muestras pretratamiento presentaron una concentración de RNA con una mediana de 95 ng/ μ l (rango 44,6-332 ng/ μ l) y para post tratamiento de 76 ng/ μ l (rango 31-171 ng/ μ l). En cuanto su integridad evaluada con el bioanalizador Agilent 2100, los valores de RIN pretratamiento fueron entre 7 a 10 y para post tratamiento entre 7,4 a 9,9; ninguno por debajo de 7 que es el límite establecido. Todas las muestras se consideraron aptas para la preparación de las librerías ya que presentaron suficiente cantidad y buena calidad de RNA. Estos resultados sugieren que el método de Ficoll junto con RNA *later* permiten conservar la integridad del RNA de los linfocitos.

4.3. RESULTADOS DE LA SECUENCIACIÓN

Se obtuvieron 30 librerías llevadas a una concentración de 25 pM, que se secuenciaron en Ion GeneStudio™ S5 System de Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific) en tres carreras diferentes, incluyendo siempre en la misma carrera muestras pre y post tratamiento. Al analizar las lecturas totales de las carreras observamos: 19.904.675, 19.138.504, 18.820.505 lecturas totales, respectivamente. Las carreras cumplieron con las métricas de calidad establecidas por el protocolo. Los datos se resumen en la tabla suplementaria S5.

Para cada una de las muestras secuenciadas, se consiguió una profundidad de un millón o más de lecturas con una longitud media de 80 pares de base por librería. Tras el filtrado de las lecturas no productivas y fuera de diana o baja calidad, todas las librerías presentaron 50% o más de lecturas productivas y rescatadas, como se detalla en la figura 19. Estos resultados indican que la secuenciación de todas las muestras fue satisfactoria y se continuó con el análisis de las secuencias.

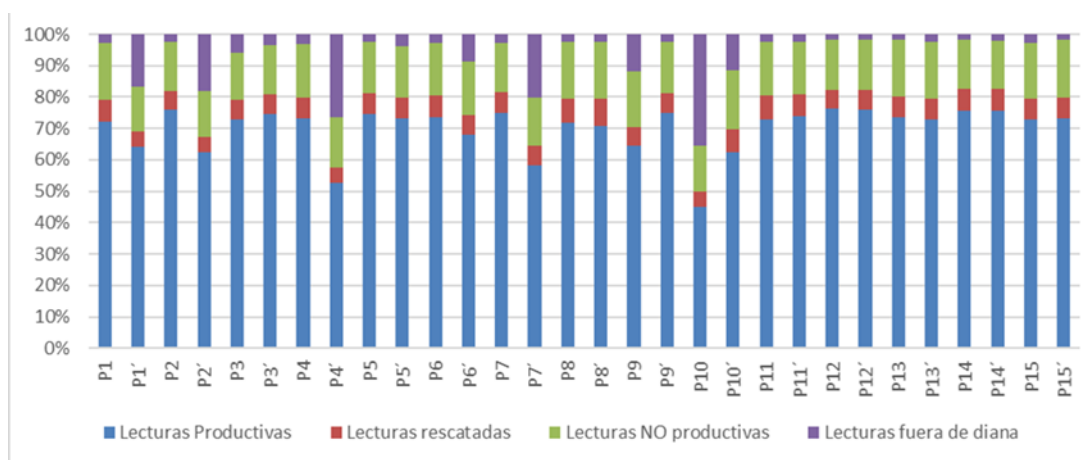


Figura 19. Distribución de lecturas obtenidas por librería. Cada barra representa las lecturas de una determinada librería. Cada color corresponde a un tipo de lectura. Por cada paciente, dos barras, muestra pretratamiento (P, izquierda) y post tratamiento (derecha, P apóstrofo).

Se observa que las librerías de los pacientes P4' (muestra post tratamiento) y P10 (muestra pretratamiento) presentaron la mayor proporción de lecturas fuera de diana (en morado). En P4' podría asociarse a que presentó la menor profundidad registrada con 960.962 lecturas totales, aunque la integridad del RNA fue alta con RIN= 9,6. En el caso del P10, presentó el valor de RIN más bajo, 7, indicando una menor integridad de la molécula de RNA, pero dentro de los límites recomendados.

4.4. ANÁLISIS DE LOS ÍNDICES DE DIVERSIDAD Y CONVERGENCIA DEL REPERTORIO TCR BETA

Las secuencias productivas y rescatadas obtenidas de cada librería son empleadas para determinar los índices que caracterizan al repertorio TCR β , explicados en detalle en metodología. A) **Riqueza**: cantidad de secuencias de nucleótidos diferentes presentes; B) **Diversidad de Shannon**: distribución del tamaño clonal, según las frecuencias de las secuencias; C) **Evenness**: similitud del tamaño clonal y D) **Convergencia**: sumatoria de las frecuencias de clonotipos que comparten la secuencia de CDR3 aminoácido y segmento V pero que es codificada por diferentes secuencias de CDR3 nucleótidos.

Cada uno de los índices fueron calculados en la muestra pretratamiento y post tratamiento. Además, se analizó el porcentaje de cambio durante el tratamiento que fue definido como: índice

postratamiento - índice pretratamiento/ índice pretratamiento. Los valores de los índices para cada paciente son recogidos en la tabla 4.

Tabla 4. Valores de índices del repertorio TCR β para cada paciente.

P	RIQUEZA			DIVERSIDAD SHANNON			EVENNESS			CONVERGENCIA		
	PRE	POST	%	PRE	POST	%	PRE	POST	%	PRE	POST	%
P1	39511	25576	-35,27	12,47	12,86	3,12	0,82	0,88	7,54	0,0055	0,0032	-41,90
P2	28465	28640	0,61	12,83	12,10	-5,74	0,87	0,82	-5,80	0,0164	0,0417	154,69
P3	28652	27542	-3,87	10,95	12,22	11,63	0,74	0,83	12,06	0,0138	0,0092	-33,05
P4	35072	17238	-50,85	14,41	12,99	-9,86	0,95	0,92	-3,30	0,0101	0,0114	13,17
P5	33284	37288	12,03	11,95	12,69	6,22	0,80	0,84	5,08	0,0122	0,0087	-28,33
P6	32937	41808	26,93	11,44	12,57	9,90	0,76	0,82	7,44	0,0645	0,0415	-35,65
P7	22544	12140	-46,15	10,30	9,14	-11,28	0,71	0,67	-5,44	0,0048	0,0029	-39,36
P8	24246	30786	26,97	10,19	12,29	20,68	0,70	0,82	17,89	0,2192	0,0726	-66,86
P9	18582	44582	139,92	12,17	12,96	6,46	0,86	0,84	-2,25	0,0050	0,0095	89,27
P10	26728	34875	30,48	12,56	12,29	-2,14	0,85	0,81	-4,63	0,0077	0,0046	-41,25
P11	57036	66973	17,42	14,48	14,55	0,49	0,92	0,91	-0,96	0,0101	0,0093	-7,89
P12	36809	30903	-16,04	14,43	14,34	-0,62	0,95	0,96	1,06	0,0074	0,0036	-52,08
P13	44776	23596	-47,30	14,78	14,00	-5,27	0,96	0,96	0,75	0,0078	0,0060	-23,58
P14	63816	47606	-25,40	13,11	12,32	-6,09	0,82	0,79	-3,53	0,0081	0,0069	-15,36
P15	25723	69067	168,50	13,81	14,81	7,21	0,94	0,92	-2,30	0,0030	0,0101	237,01

P: Paciente **PRE:** datos pretratamiento **POST:** datos post tratamiento **%:** porcentaje de cambio

En base a estos resultados, es posible evaluar el repertorio TCR en cada paciente como se detallará a continuación. Cabe remarcar que la valoración de la dinámica del repertorio (% cambio) es factible con el empleo de la biopsia líquida, ya que se pudo obtener muestras en diferentes momentos de una forma mínimamente invasiva.

4.4.1. Evaluación de las características del repertorio TCR β según características demográficas y hábito tabáquico de los pacientes.

En primer lugar, una vez obtenidos los índices que caracterizan el repertorio TCR β (Pre, Post y % cambio) para cada paciente se analizó la asociación con las características demográficas como edad, sexo y hábito tabáquico (tabla 5).

Tabla 5. Características del repertorio TCRβ según características demográficas de los pacientes. Los valores corresponden a la mediana para cada índice, pretratamiento, post tratamiento y % de cambio, según la característica demográfica. M: masculino F: femenino NF/EX F: nunca fumador/ exfumador.

		EDAD			SEXO			HÁBITO TABÁQUICO		
		<60 años	≥60 años	P valor	M	F	P valor	Fumador	NF/EXF	P valor
PRE	Riqueza	36.809	30.795	0,540	33.284	29.330	0,433	27.597	44.776	0,010
	Diversidad Shannon	13,81	12,06	0,086	12,56	12,99	0,602	12,32	14,43	0,050
	Evenness	0,94	0,81	0,086	0,82	0,90	0,296	0,84	0,92	0,221
	Convergencia	0,0074	0,0111	0,037	0,0101	0,0064	0,361	0,0089	0,0081	0,624
POST	Riqueza	30.903	34.037	0,903	30.786	43.195	0,240	29.713	41.808	0,270
	Diversidad Shannon	14,00	12,44	0,111	12,32	13,48	0,117	12,49	14,00	0,142
	Evenness	0,92	0,83	0,086	0,83	0,88	0,240	0,83	0,91	0,391
	Convergencia	0,0046	0,0094	0,066	0,0087	0,0098	0,361	0,0094	0,0069	0,624
% CAMBIO	Riqueza	-16,0	6,3	1,000	-3,9	83,4	0,192	6,3	-16,0	0,462
	Diversidad Shannon	-0,6	3,4	0,903	-0,6	6,8	0,240	4,7	-0,6	0,624
	Evenness	0,8	-1,6	0,903	-1,0	-0,8	0,794	-2,3	0,8	0,713
	Convergencia	-41,3	-21,8	0,391	-33,1	32,8	0,151	-30,7	-23,6	0,806

Considerando la edad de los pacientes, se observa que los pacientes de 60 años o mayores tuvieron una convergencia pretratamiento superior, es decir, mayor cantidad de clonotipos con idéntica secuencia de CDR3 AA y segmento V, pero diferente en CDR3 NT, en comparación con los pacientes de edades menor a 60 años (0,0111 vs 0,0074; $p=0,037$) (figura 20 A). Sin embargo, post tratamiento esta diferencia se registra como una tendencia (0,0094 vs 0,0046; $p=0,066$) (figura 20B). Cabe destacar que el paciente 8 de 63 años presentó la convergencia más alta de la cohorte tanto pre como post tratamiento (0,2192 y 0,0726, respectivamente).

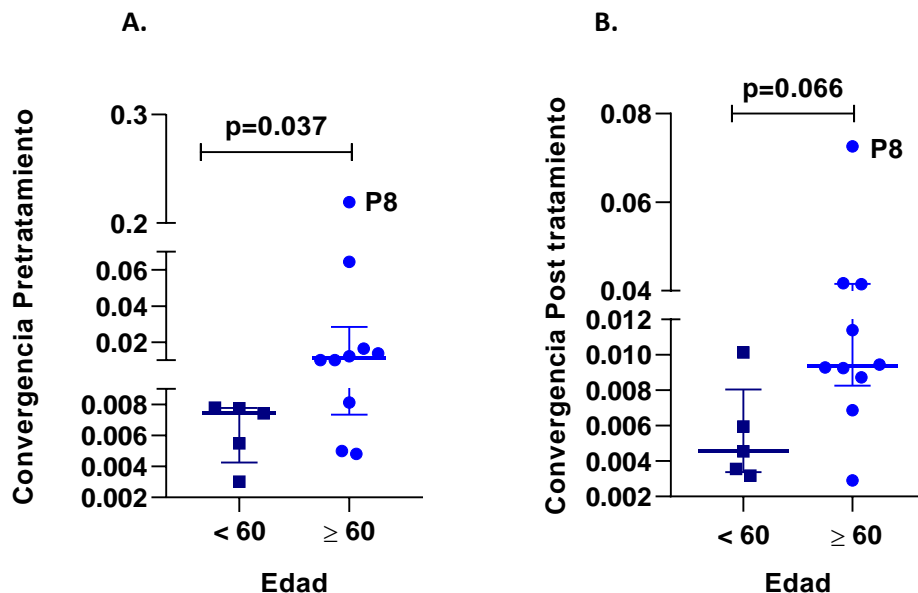


Figura 20. Convergencia en función de la edad. A. Convergencia pretatamiento <60 años vs ≥ 60años (0,0074 vs 0,0111; $p=0,037$). B. Convergencia post tratamiento <60 años vs ≥ 60años (0,0046 vs 0,0094; $p=0,066$). La línea central representa la mediana y las líneas de error, el rango intercuartílico.

Actualmente, se tiene poco conocimiento sobre los datos de convergencia en pacientes oncológicos. Los TCR convergentes surgen debido a una estimulación antigénica crónica, en lugar de una aguda pero transitoria, como en una enfermedad infecciosa. Por lo tanto, es un indicador de la

respuesta de células T a antígenos tumorales o a autoantígenos como en las enfermedades autoinmunes crónicas. Es importante remarcar que la elección de la tecnología empleada para medir la convergencia es crucial, ya que los errores específicos de la plataforma de secuenciación, el número de ciclos de PCR utilizados para la amplificación de la librería, la fidelidad de la polimerasa elegida, y la eficacia de los *software* bioinformáticos para eliminar los errores de PCR o secuenciación, pueden determinar la fiabilidad de los clones convergentes. Un estudio concluyó que Ion Torrent es la tecnología más apropiada disponible al momento para estudiar la convergencia (Looney et al.,2020).

En cuanto a la diversidad de Shannon, en los TCRs pretratamiento, se observa en pacientes de 60 años o mayores una tendencia a ser inferior que en los que presentan una edad menor a 60 años (12,06 vs 13,81; $p=0,086$) (Figura 21 A). A su vez, la diversidad normalizada, *evenness*, pre y post tratamiento, presenta la misma tendencia con respecto a la edad (0,81 vs 0,94; $p=0,086$ y 0,83 vs 0,92; $p=0,086$, respectivamente) (figura 21 B-C).

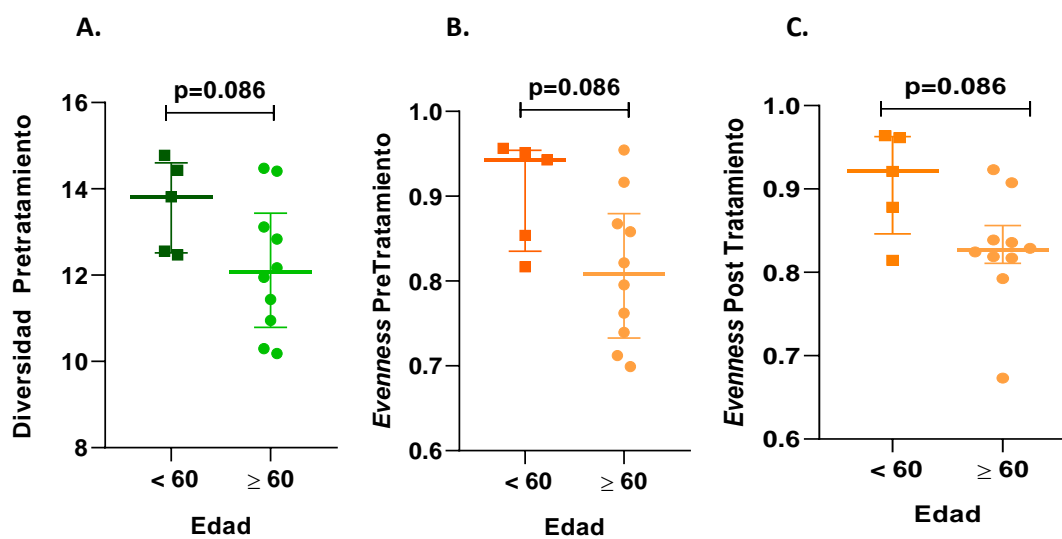


Figura 21. Diversidad y *evenness* en función de la edad. A. Diversidad de Shannon pretratamiento <60 años vs ≥60 años (13,81 vs 12,06; $p=0,086$). B. *Evenness* pretratamiento <60 años vs ≥60 años (0,94 vs 0,81; $p=0,086$). C. *Evenness* post tratamiento <60 años vs ≥60 años (0,92 vs 0,83; $p=0,086$). La línea central representa la mediana y las líneas de error, el rango intercuartílico.

Estos resultados son consistentes con otros estudios realizados en CPNM. Liu et al., indicaron que los PBMC presentaron menor diversidad en pacientes mayores a 60 años (Liu et al.,2019). Mientras que Wang et al., observaron el mismo patrón en linfocitos infiltrantes de tumor y tejido pulmonar normal (Wang et al.,2019).

Asimismo, se ha demostrado previamente que el envejecimiento está asociado a una disminución de la respuesta inmune adaptativa; un estudio realizado en pacientes sanos de edades entre 6 a 90 años, concluye que la diversidad del repertorio TCR β disminuye a lo largo de la vida (Britanova et al.,2014).

Con respecto al hábito tabáquico, se observa que la riqueza pretratamiento es inferior en fumadores comparado con los nunca o exfumadores (27.597 vs 44.776; $p=0,010$) (figura 22 A). Además, la diversidad de Shannon pretratamiento presenta valores más bajos en los pacientes fumadores versus a los nunca o exfumadores (12,32 vs 14,43; $p=0,050$) (figura 22 B).

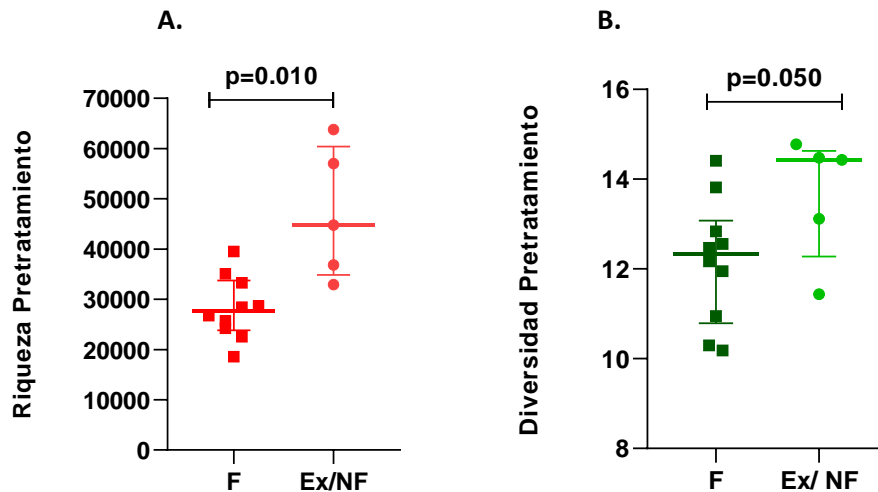


Figura 22. Riqueza y diversidad de Shannon pretratamiento en función del hábito tabáquico. A. Riqueza F vs NF/EXF (27.597 vs 44.776; $p=0,010$). B. Diversidad de Shannon F vs NF/EXF (12,32 vs 14,43; $p=0,050$). La línea central representa la mediana y las líneas de error, el rango intercuartílico. F: fumador. EX/NF: Ex/ nunca fumador.

Estos resultados confirman el efecto negativo generado por los componentes del humo de tabaco en la respuesta inmune (Qiu et al.,2017). Teniendo en cuenta que los fumadores presentan mayor carga mutacional tumoral (TMB) (revisado por Chen y Mellman,2017), podría pensarse en este escenario, que esas mutaciones no generan neoantígenos debido a que el repertorio de TCR en estos pacientes presenta baja riqueza y diversidad.

Para el resto de los índices analizados no se observan diferencias estadísticamente significativas. Liu et al, también observaron que la riqueza y diversidad fueron similares para ambos sexos (Liu et al.,2019).

4.4.2. Evaluación de las características del repertorio TCR β según la respuesta al tratamiento y variables pronósticas.

Los índices del repertorio TCR β , riqueza, diversidad Shannon, *evenness* y convergencia, se analizaron con respecto a la respuesta al tratamiento. La respuesta se clasificó en respondedores y no respondedores; los primeros son los que consiguen una respuesta completa o parcial al tratamiento, y los segundos, los que presentan una enfermedad estable o progresan. Asimismo, cada índice fue estratificado en “alto y bajo” en función a la mediana, y se determinó su correlación con la supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG).

4.4.2.1. Índices pretratamiento.

Los resultados obtenidos pretratamiento se representan en la figura 23.

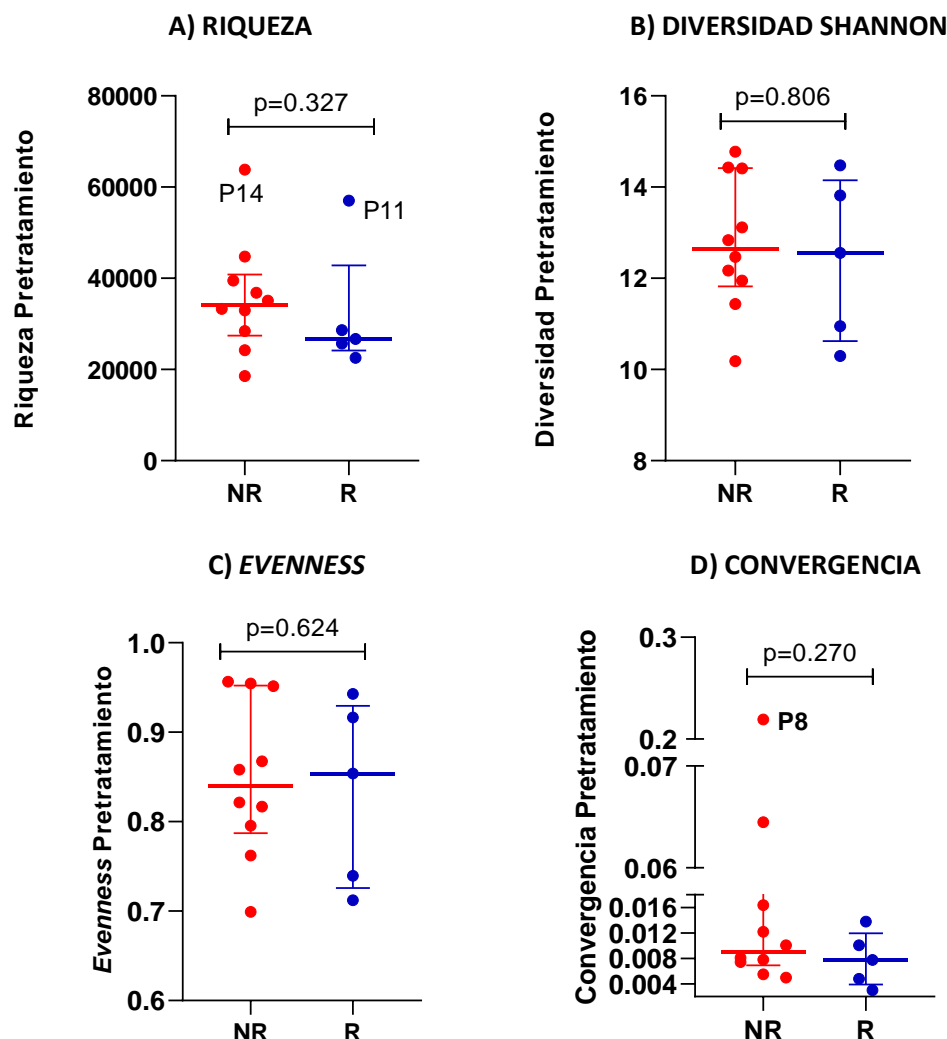


Figura 23. Características del repertorio TCR pretratamiento, según respuesta al tratamiento. A. Riqueza, NR vs R mediana, (34.178 vs 26.728; $p=0,327$) B. Diversidad de Shannon, NR vs R (12,65 vs 12,56; $p=0,806$) C. *Evenness*, NR vs R (0,84 vs 0,85; $p=0,624$) D. Convergencia, NR vs R (0,009 vs 0,008; $p=0,270$). NR: No respondedores. R: respondedores. La línea central representa la mediana y las líneas de error, el rango intercuartílico.

No se registran diferencias significativas para los índices pretratamiento entre pacientes respondedores y no respondedores.

Sin embargo, se observa que pacientes que tenían una elevada riqueza, es decir una gran cantidad de clonotipos diferentes, como son el paciente 14 (63.816 clonotipos) y el 11 (57.036 clonotipos) a diferencia del resto de pacientes respondían de manera muy diferente al tratamiento. En la figura 23 A se muestra como el paciente 14 progresa (SLP= 2,9 meses), mientras que el paciente 11 con un número de clonotipos similar presenta una respuesta parcial.

Estos resultados son excepcionales, ya que se ha demostrado en estudios previos en melanoma (Postow et al.,2015) y cáncer de páncreas (Hopkins et al.,2018) tratados con anti-CTLA4, que es necesario disponer de un amplio repertorio de TCR en sangre, es decir, elevada riqueza y diversidad,

para que exista mayor probabilidad de reconocer antígenos tumorales y tras la acción del ICB ser reactivados, limitando así el escape inmune de las células tumorales.

Hasta el momento, hay pocos trabajos realizados en CPNM en estadios avanzados y, principalmente se centran en el análisis de linfocitos infiltrantes del tumor. Sin embargo, hay que destacar que nuestro estudio pretende buscar biomarcadores inmuno-oncológicos mínimamente invasivos considerando que los linfocitos hallados en sangre periférica recirculan entre el tumor y la circulación general.

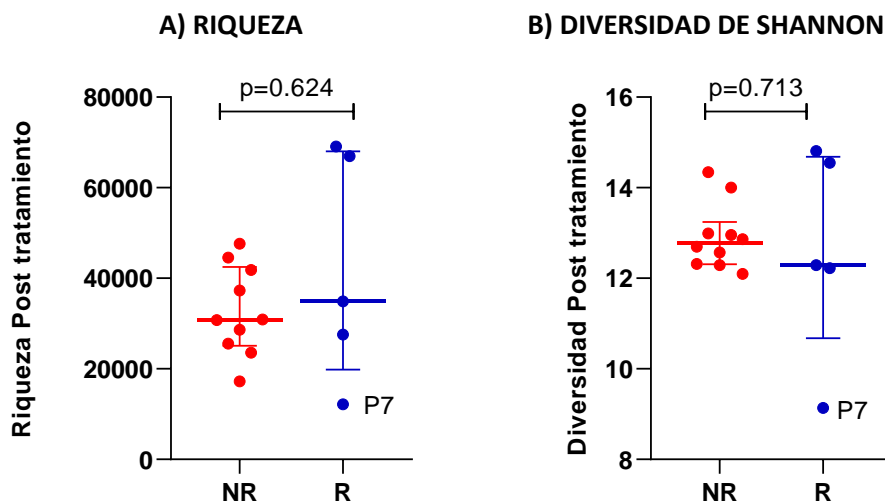
En cuanto a los estudios existentes de riqueza, diversidad y clonalidad del repertorio TCR en sangre periférica, son contradictorios. Han et al., demostraron que analizando PBMC no encontraron diferencias significativas con respecto a la respuesta al tratamiento y SLP, como en este trabajo. En cambio, cuando analizan a los linfocitos T CD8+ PD1+ aislados mediante técnicas de citometría de flujo, se demuestra que a mayor diversidad pretratamiento se experimentan mejores respuestas y mayor SLP. Ellos sugieren que dentro de los PBMC hay varios TCR específicos de antígenos no tumorales que diluyen a los TCR específicos del tumor (Han et al., 2020). Asimismo, Liu y colaboradores tampoco encuentran asociación entre la diversidad pretratamiento de PBMC de pacientes con CPNM en estadios avanzados bajo tratamientos convencionales, como quimioterapia, radioterapia y TKI, con relación al beneficio clínico de una SLP mayor de 6 meses (Liu et al.,2019).

En el análisis de la convergencia según la respuesta, las frecuencias entre respondedores y no respondedores es similar. En cambio, el paciente 8, en el grupo de no respondedores, presenta una alta frecuencia de clones convergentes (0,2192). Sin embargo, Looney et al., demostraron en melanoma, adenocarcinoma de células claras y carcinoma de próstata, que pacientes que respondían a ICB presentaban una mayor convergencia pretratamiento (Looney et al., 2020), reforzando la teoría que las células T con TCR convergentes tienen como diana a antígenos tumorales.

Con respecto a la SLP y SG, no se registran diferencias significativas para los índices pretratamiento.

4.4.2.2. Índices post tratamiento

Los resultados obtenidos para las secuencias post tratamiento se representan en la figura 24.



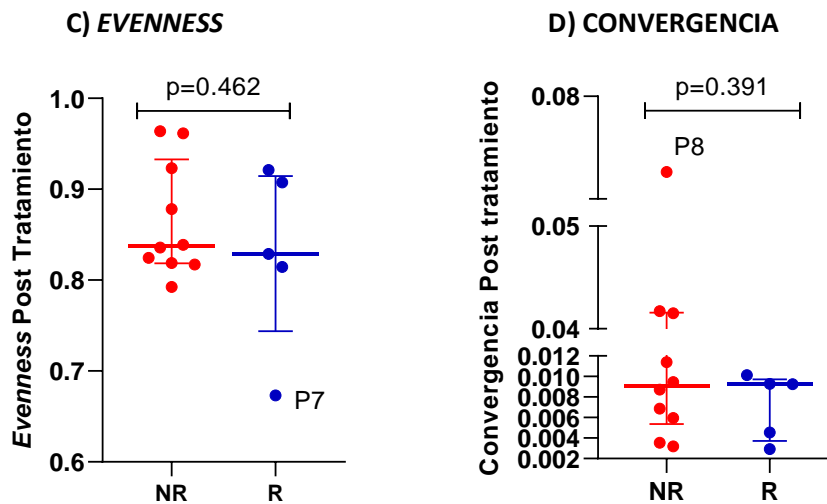


Figura 24. Características del repertorio TCR post tratamiento, según respuesta al tratamiento. A. Riqueza, NR vs R mediana (30.844 vs 34.875; $p=0,624$) B. Diversidad de Shannon, NR vs R (12,78 vs 12,29; $p= 0,713$) C. *Evenness*, NR vs R (0,84 vs 0,83; $p=0,462$) D. Convergencia, NR vs R (0,0091 vs 0,0092; $p=0,391$). NR: No respondedores R: Respondedores. La línea central representa la mediana y las líneas de error, el rango intercuartílico.

No se evidencian diferencias significativas para los índices post tratamiento entre pacientes respondedores y no respondedores.

Cabe destacar que el paciente 7 tuvo un comportamiento único ya que la riqueza, diversidad Shannon y *evenness* fueron los más bajos de la cohorte (12.140, 9,13 y 0,67, respectivamente), lo cual indica que presentó una baja diversidad con expansión clonal, mostrando inicialmente una respuesta parcial al tratamiento. A pesar de ello, 4 meses después, evoluciona con progresión. Esto sugiere que los clonotipos expandidos no han sido suficientes para hacer frente a los antígenos tumorales, siendo necesaria una mayor comprensión de los mecanismos y las respuestas.

El paciente 8 se dispersa en la figura 24D, presentando la mayor frecuencia de clones convergentes (0,0726), al igual que previo al tratamiento.

Con respecto a la SLP y SG, no se registran diferencias significativas para los índices post tratamiento.

4.4.2.3. Dinámica de índices

El comportamiento de cada índice durante el tratamiento es evaluado por el % de cambio entre las muestras pre y post tratamiento. Los resultados son representados en la figura 25.

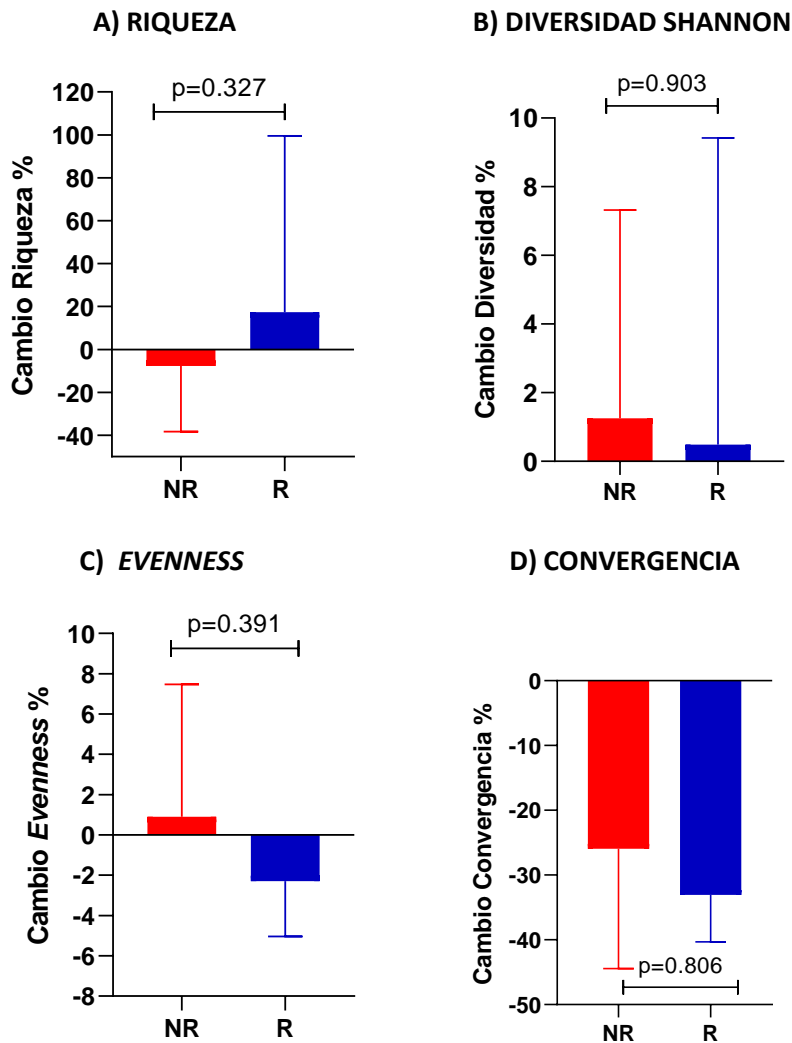


Figura 25. Dinámica de las características del repertorio TCR, según respuesta al tratamiento. A. Riqueza, NR vs R, mediana (-7,7 vs 17,4; $p=0,327$) B. Diversidad de Shannon, NR vs R (1,25 vs 0,49; $p=0,903$) C. *Evenness*, NR vs R (0,9 vs -2,3; $p=0,391$) D. Convergencia, NR vs R (-26 vs -33; $p=0,806$). NR: No respondedores R: Respondedores. La altura de la columna representa la mediana y las barras de error, el rango intercuartílico.

Se evidencia que, durante el tratamiento con inmunoterapia, el repertorio TCR presenta variaciones. Sin embargo, no se registran diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de cambio de los índices evaluados y la respuesta al tratamiento.

Se observa que la riqueza muestra una tendencia a aumentar con el tratamiento en los pacientes respondedores, mientras que los no respondedores, la disminuyen (figura 25 A). Por otro lado, la diversidad de Shannon no tiene un patrón distintivo, ya que aumentó en ambas categorías de pacientes (figura 25 B).

En referencia, los pacientes respondedores exhiben una tendencia a disminuir el *evenness*, mientras que los no respondedores, el cambio tiende a un aumento. Teniendo en cuenta que a menor

evenness, mayor clonalidad, los respondedores presentarían un aumento de expansión clonal tras el tratamiento (figura 25 C).

Nuestros resultados con respecto a la clonalidad están parcialmente de acuerdo con estudios previos en CPNM en estadios avanzados tratados con ICB. Anagnostou et al. observan que clones hallados en el tumor antes del tratamiento, presentan una expansión en sangre periférica post tratamiento que se correlaciona con una respuesta radiográfica y un aclaramiento del DNA tumoral circulante (Anagnostou et al.,2019). Asimismo, Han et al. demuestran que el aumento de clonalidad de linfocitos CD8+ PD1+ de sangre, se asocia a una mayor reducción del tamaño tumoral y mayor SLP (Han et al.,2020). Mientras que, el estudio de Kim et al. muestra que el aumento de proliferación (aumento de marcador ki-67) de linfocitos periféricos CD8+ PD1+ tras una semana bajo tratamiento se correlaciona con mejores respuestas y un pronóstico de supervivencia más favorable (Kim et al.,2019).

Por otro lado, en pacientes con CPNM resecables en neoadyuvancia con anti-PD-1, Zhang et al, comprueban que el tejido tumoral post tratamiento de pacientes respondedores es enriquecido con clonotipos expandidos en sangre (aumentando la frecuencia) entre la semana 2 y 4 desde el inicio de la terapia (Zhang et al.,2020).

Además, en varios tipos tumorales, Wu et al., muestran que existe una fuerte relación entre la expansión clonal de linfocitos T CD8+ efectoros en sangre periférica y la infiltración de estos en el tejido tumoral y el tejido normal adyacente, que favorece la respuesta al tratamiento con ICB (Wu et al.,2020).

Estos resultados explicarían que el bloqueo de la interacción PD-1/ PD-L1 ejercido por los anticuerpos sería efectivo, permitiendo la reactivación y proliferación de los linfocitos que reconocen antígenos tumorales. Sin embargo, nuestros hallazgos deben ser reforzados aumentando la cohorte de pacientes.

Cuando se analiza el cambio de convergencia y la respuesta de los pacientes no se observan diferencias significativas (figura 25 D). Como habíamos mencionado, el paciente 8 presentó tanto pre y post tratamiento, la convergencia más alta de la cohorte. Sin embargo, la dinámica de su convergencia experimentó una disminución muy marcada tras el tratamiento, de 0,2192 a 0,0726. Clínicamente, este paciente mayor de 60 años, fumador, de sexo masculino, en estadio IV b desarrolló progresión de la enfermedad a los 2,8 meses de iniciado el tratamiento y finalmente exitus, con una SG de 5,9 meses.

En cuanto a la SLP y SG no existen diferencias significativas con relación a la dinámica de los índices.

4.5. ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA DE SEGMENTOS V Y J

Una vez realizados los análisis de los índices, se procedió a evaluar la posible asociación entre la frecuencia de clonotipos compuestos con un determinado segmentos V o J, con la respuesta al tratamiento y variables pronósticas. Recordemos que la región CDR3 del TCR conformada por el extremo final del segmento V y el J, está involucrada en el reconocimiento de los antígenos, por lo tanto, presenta la especificidad de la respuesta anti- tumoral. Se analizó las frecuencias de cada segmento V y J, para las muestras pre y post tratamiento. Además, se determinó la dinámica entre estos tiempos, calculando el ratio de frecuencias POST/PRE. La respuesta se categorizó en respondedores vs no respondedores y beneficio clínico (BC) vs no beneficio clínico (NBC). Siendo los pacientes con BC los que presentan respuesta parcial o enfermedad estable, mientras que con NBC son los que progresan. Asimismo, cada segmento fue estratificado en “alto y bajo” en función a la mediana de su frecuencia, y se determinó su correlación con SLP y SG.

4.5.1. Análisis de la frecuencia de segmentos V y J pretratamiento

Las lecturas obtenidas pretratamiento para todos los pacientes, mapearon con 54 segmentos V y 13 segmentos J. Siendo los segmentos presentes con mayor frecuencia, el **TRBV20_1** y el **TRBJ1_1** (mediana, 0,0914 y 0,1323, respectivamente). La frecuencia para cada segmento V y J, se representan en las figuras 26 y 27, respectivamente.

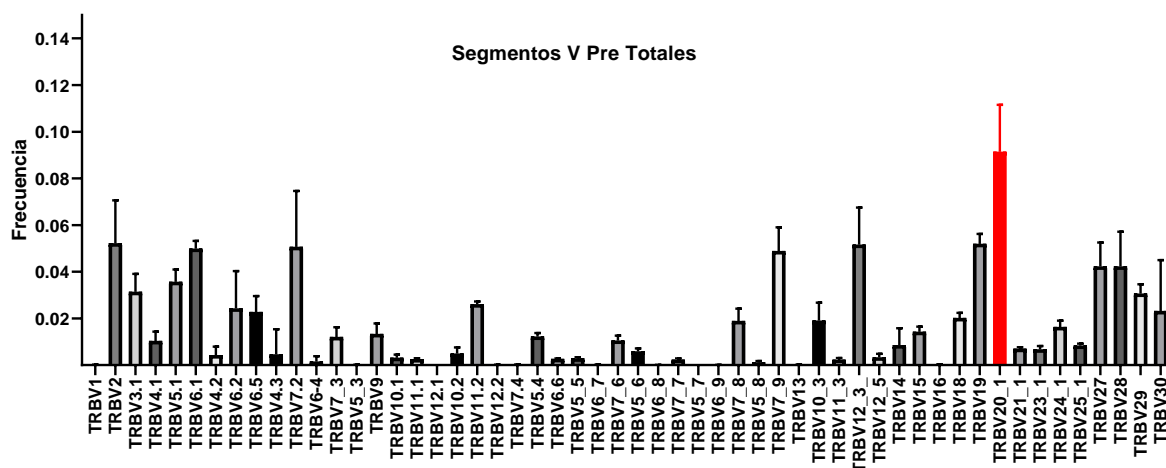


Figura 26. Frecuencia de segmentos V pretratamiento. La altura de cada barra representa la mediana de la frecuencia y las barras de error, el rango intercuartílico. La barra de color rojo corresponde al segmento TRBV20_1 de mayor frecuencia.

Nuestros resultados están en concordancia con el estudio de Wang et al, donde determinan que el segmento TRBV20_1 fue hallado con mayor frecuencia en los clonotipos residentes en tejido tumoral pero no en tejido pulmonar normal (Wang et al.,2019). Esto podría explicar que los TCR conformados por este segmento estarían involucrados en el reconocimiento de un antígeno tumoral específico.

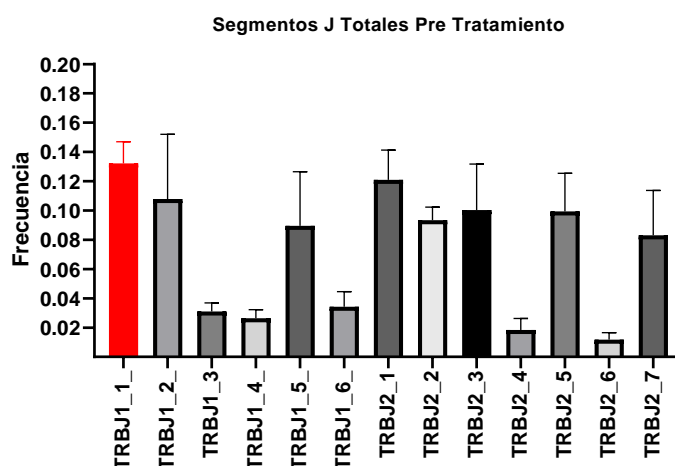


Figura 27. Frecuencia de segmentos J pretratamiento. La altura de cada barra representa la mediana de la frecuencia y las barras de error, el rango intercuartílico. La barra de color rojo corresponde al segmento TRBJ1_1 de mayor frecuencia.

Al analizar la frecuencia de clonotipos compuestos por un determinado segmento V o J y la asociación con la respuesta al tratamiento, no se observan diferencias significativas con los segmentos más frecuentes, TRBV20_1 y TRBJ 1_1. Por otra parte, los clonotipos con el segmento **TRBV7_4** estuvieron presente con mayor frecuencia en pacientes NR en comparación con los R ($2,6 \times 10^{-4}$ vs $1,0 \times 10^{-4}$; $p=0,007$) (figura 28A). También fue más frecuente en pacientes con NBC con relación a los pacientes que presentan BC ($3,7 \times 10^{-4}$ vs $1,8 \times 10^{-4}$; $p=0,003$) (figura 28 B). Mientras que el segmento **TRBV11_1** fue más frecuente en pacientes con BC con relación a los de NBC ($2,9 \times 10^{-3}$ vs $2,3 \times 10^{-3}$; $p=0,025$) (figura 28C).

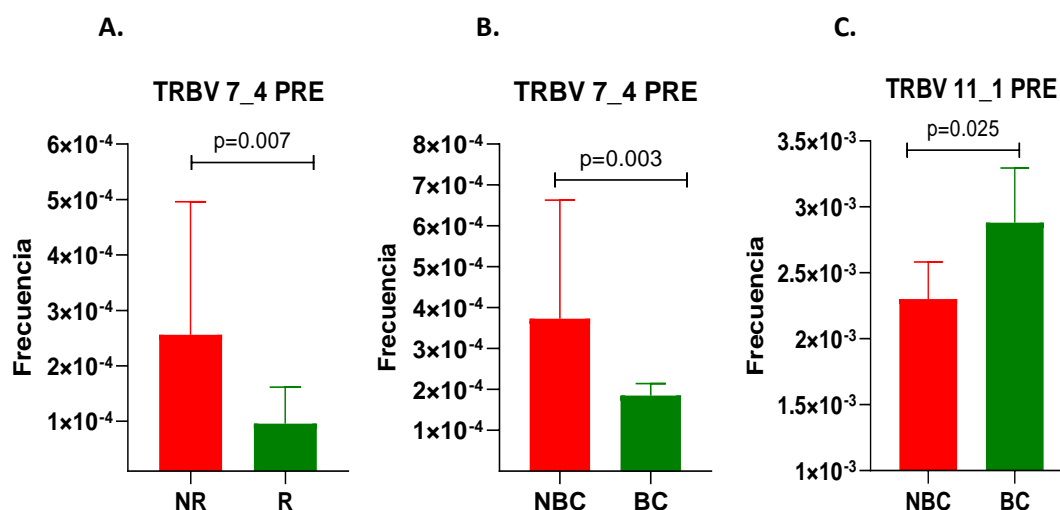


Figura 28. Relación entre respuesta al tratamiento o beneficio clínico a ICB y frecuencia de segmentos V pretratamiento. A. TRBV7_4, NR vs R ($2,6 \times 10^{-4}$ vs $1,0 \times 10^{-4}$; $p=0,007$). B. TRBV7_4 NBC vs BC ($3,7 \times 10^{-4}$ vs $1,8 \times 10^{-4}$; $p=0,003$) C. TRBV11_1 NBC vs BC ($2,3 \times 10^{-3}$ vs $2,9 \times 10^{-3}$; $p=0,025$). NR: No respondedores, R: Respondedores, NBC: No beneficio clínico, BC: Beneficio clínico). Las barras representan la mediana y las líneas de error, el rango intercuartílico.

Además, se demostró que los pacientes que presentaban valores de frecuencia de **TRBV7_4** “bajos” (menor a la mediana) tenían mayor SLP que los pacientes con frecuencias “altas” (superior a la mediana) (9,9 meses, intervalo de confianza 95% (IC), 9,6-10,1 vs 3,4 meses (IC), 2,0 -4,8; Log-rank $p=0,004$) (figura29).

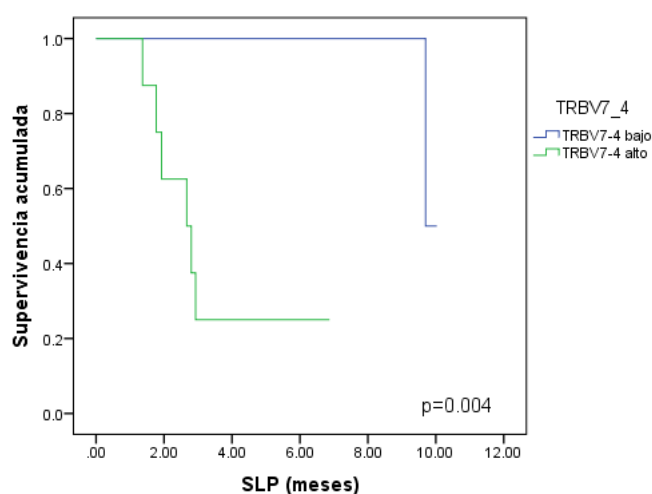


Figura 29. Kaplan-Meier para frecuencia de segmento TRBV7_4 asociada a SLP. Azul: frecuencias de segmento TRBV7_4 bajo, según mediana. Verde frecuencias TRBV7_4 alto, según mediana ($p=0,004$).

En cuanto a los segmentos J no se registran diferencias significativas para ningún segmento con relación a la respuesta al tratamiento.

4.5.2. Análisis de la frecuencia de segmentos V y J post tratamiento

Las lecturas obtenidas post tratamiento para todos los pacientes, mapearon con 55 segmentos V y 13 segmentos J. Al igual que pretratamiento, los más frecuentes fueron **TRBV20_1** y **TRBJ1_1** (0,0902 y 0,1358, respectivamente). Las frecuencias para todos los segmentos V y J post tratamiento se representan en las figuras 30 y 31, respectivamente.

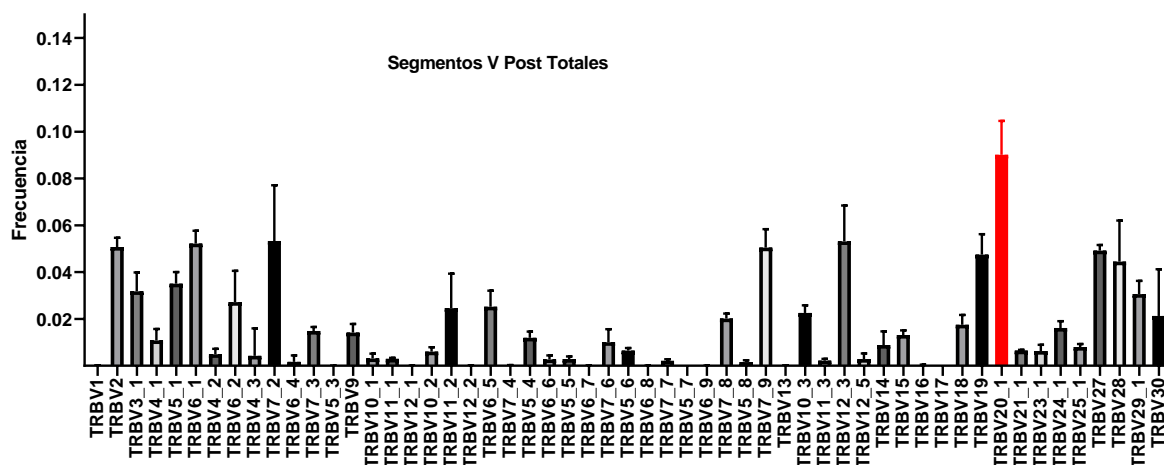


Figura 30. Frecuencia de segmentos V post tratamiento. La altura de cada barra representa la mediana de la frecuencia y las barras de error, el rango intercuartílico. La barra de color rojo corresponde al segmento TRBV20_1 de mayor frecuencia.

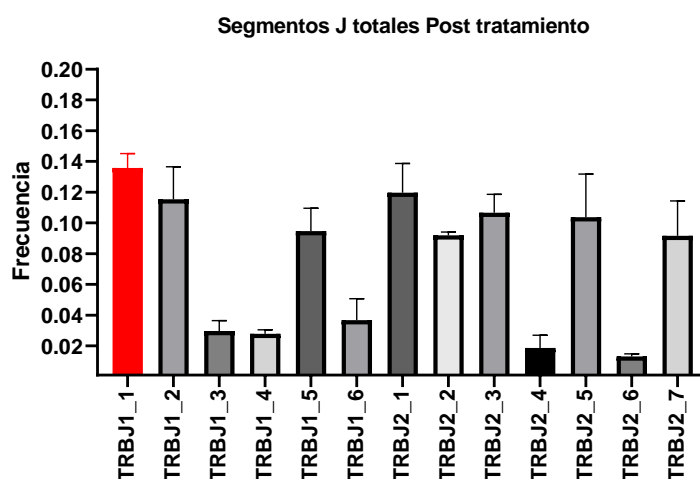


Figura 31. Frecuencia de segmentos J post tratamiento. La altura de cada barra representa la mediana de frecuencia y las barras de error, el rango intercuartílico. La barra de color rojo corresponde al segmento TRBJ1_1 de mayor frecuencia.

Al analizar la asociación con la respuesta al tratamiento, no existe diferencias estadísticamente significativas para los clonotipos conformados con los segmentos más frecuentes.

Sin embargo, se observan diferencias significativas para clonotipos con los segmentos V, **TRBV1**, **TRBV6_4**, **TRBV 7_7** y **TRBV27**. Siendo más frecuentes en NR versus R, TRBV1 (2×10^{-4} vs 1×10^{-4} ; $p=0,037$) (figura 32 A); TRBV6_4 ($3,1 \times 10^{-3}$ vs 1×10^{-3} ; $p=0,014$) (figura 32 B); y TRBV7_7 ($2,5 \times 10^{-3}$ vs $1,7 \times 10^{-3}$; $p=0,037$) (figura 32 C). Por otro lado, TRBV27 fue más frecuente en R vs NR ($0,051$ vs $0,042$; $p=0,037$) (figura 32 D).

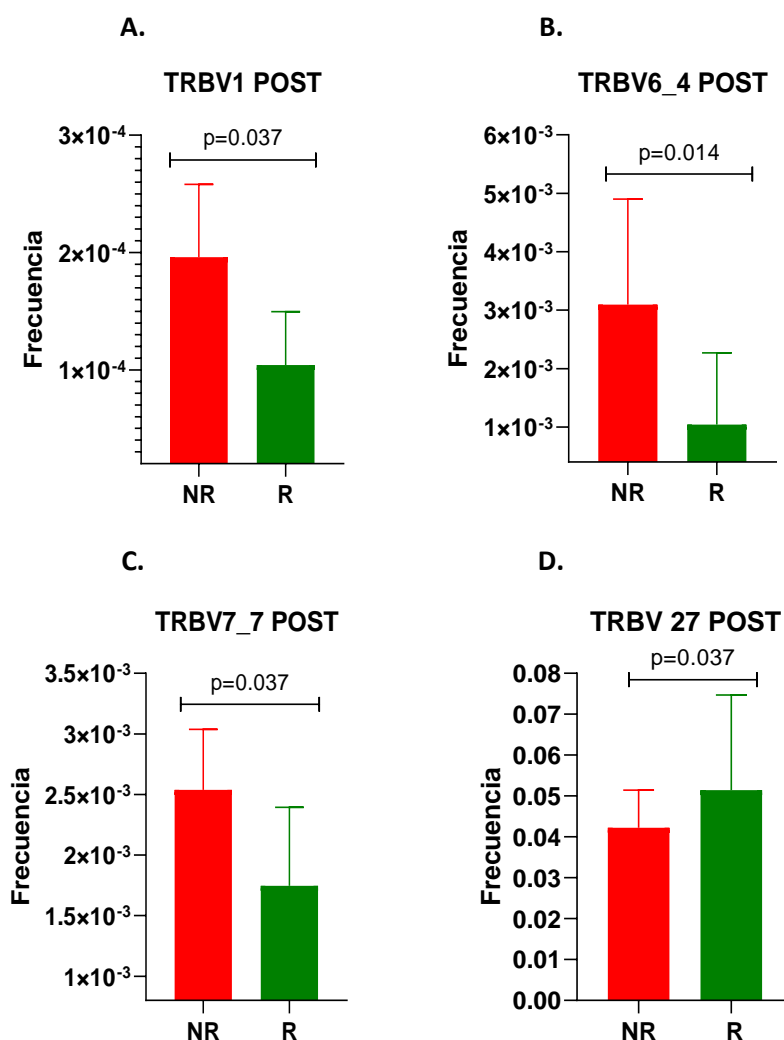


Figura 32. Relación entre respuesta al tratamiento con ICB y frecuencia segmentos V post tratamiento. A. TRBV1 NR vs R, (2×10^{-4} vs 1×10^{-4} ; $p=0,037$). B. TRBV6_4 NR vs R ($3,1 \times 10^{-3}$ vs 1×10^{-3} ; $p=0,014$). C. TRBV 7_7 NR vs R ($2,5 \times 10^{-3}$ vs $1,7 \times 10^{-3}$; $p=0,037$). D. TRBV27 R vs NR ($0,051$ vs $0,042$; $p=0,037$). NR: No respondedores, R: respondedores. Las barras representan la mediana y las líneas de error, el rango intercuartílico.

En cuanto a los pacientes que presentaron BC tuvieron con relación a los pacientes que progresaron mayores frecuencias de clonotipos con los segmentos **TRBV 11_1** ($3,1 \times 10^{-3}$ vs $2,2 \times 10^{-3}$; $p=0,018$) (figura 33 A); y **TRBV30** ($0,0325$ vs $0,0106$; $p=0,045$) (figura 33 B). Por el contrario, **TRBV11_2** fue más frecuente en los pacientes que progresaron ($0,0405$ vs $0,0227$; $p=0,007$) (figura 33 C).

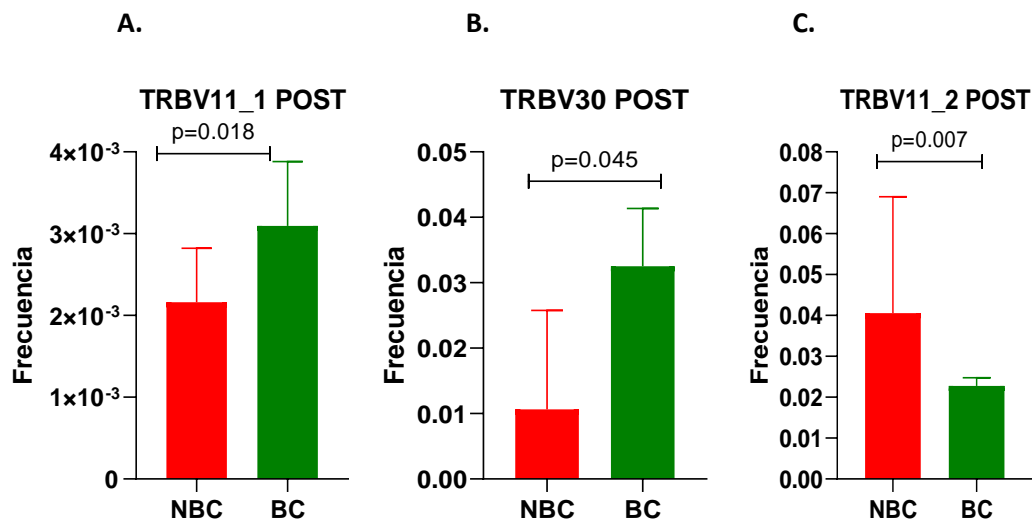


Figura 33. Relación entre beneficio clínico a ICB y frecuencia segmentos V post tratamiento. A. TRBV 11_1 BC vs NBC ($3,1 \times 10^{-3}$ vs $2,2 \times 10^{-3}$; $p=0,018$). B. TRBV30 BC vs NBC (0,0325 vs 0,0106; $p=0,045$). C. TRBV 11_2 NBC vs BC (0,0405 vs 0,0227; $p=0,007$). NBC: No beneficio clínico, BC: beneficio clínico. Las barras representan la mediana y las líneas de error, el rango intercuartílico.

Con respecto a los segmentos J, no se observan diferencias significativas entre las distintas respuestas.

Al momento no existen trabajos que evalúen la frecuencia pre y post tratamiento de cada uno de los segmento con relación a la respuesta. Nuestros resultados confirman que la frecuencia de ciertos clonotipos presentes en sangre periférica se correlaciona con la respuesta al tratamiento. Además, sugieren que el segmento TRBV11_1 presente tanto pre como post tratamiento en pacientes con beneficio clínico se haya conservado para reconocer un antígeno tumoral, si bien su frecuencia no es muy alta.

4.5.3. Dinámica de frecuencia de segmentos V y J

Finalmente, el cálculo del ratio de frecuencia POST/ PRE para cada segmento V y J se representan en las figuras suplementarias S1 y S2.

Cuando se analizan la dinámica de clonotipos en base a su composición de segmentos V o J con relación a la respuesta al tratamiento, se observa que los clonotipos con segmentos **TRBV6_1** y **TRBV6_4** disminuyen tras el tratamiento en los pacientes respondedores, en comparación con los no respondedores que aumentan (0,97 vs 1,09 y 0,72 vs 1,37; $p=0,020$, respectivamente) (figura 34 A y B, respectivamente).

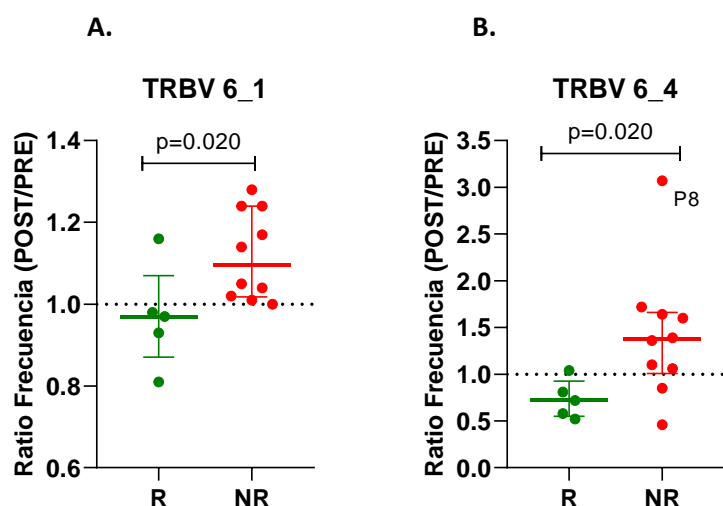


Figura 34. Dinámica de frecuencia de segmentos V según respuesta al tratamiento con ICB. A. TRBV6_1 R vs NR (0,97 vs 1,09; $P=0,020$). B. TRBV6_4 R vs NR (0,72 vs 1,37; $p=0,020$). R: respondedores, NR: No respondedores. La línea central representa la mediana y las líneas de error, el rango intercuartílico.

Para el segmento TRBV6_4 (figura 33 B), el paciente 8 experimenta el mayor cambio de frecuencias durante el tratamiento (ratio POST/PRE = 3,07). El aumento de frecuencias de clonotipos conformados por este segmento en sangre periférica, podría haber contribuido también al pronóstico desfavorable de este paciente, como se ha mencionado.

Asimismo, el segmento **TRBJ2_6**, disminuye en R y aumenta discretamente en los NR (0,80 vs 1,09; $p=0,014$) (figura 35).

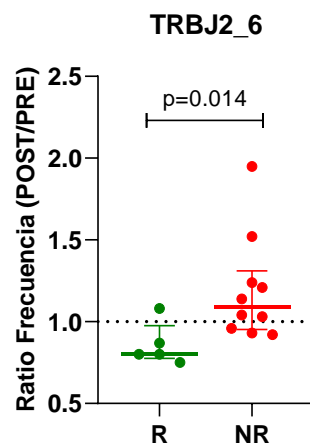


Figura 35. Dinámica de clonotipos con segmentos J según respuesta al tratamiento con ICB. TRBJ2_6 R vs NR (0,80 vs 1,09; $p=0,014$). NR: No respondedores, R: respondedores. La línea central representa la mediana y las líneas de error, el rango intercuartílico.

Cuando se analizaron la dinámica de clonotipos con relación al beneficio clínico, se observa que los clonotipos con segmentos **TRBV7_7** y **TRBV9** disminuyen tras el tratamiento en los pacientes que experimentaron BC en comparación al aumento que presentan los que progresaron (0,94 vs 1,06; $p=0,025$ y 0,93 vs 1,18; $p=0,034$, respectivamente) (figura 36 A y B, respectivamente). Mientras que los clonotipos con segmento **TRBV4_1** aumentan en mayor proporción en los pacientes que progresaron con relación a los con BC (1,25 vs 1,09; $p=0,018$) (figura 36 C).

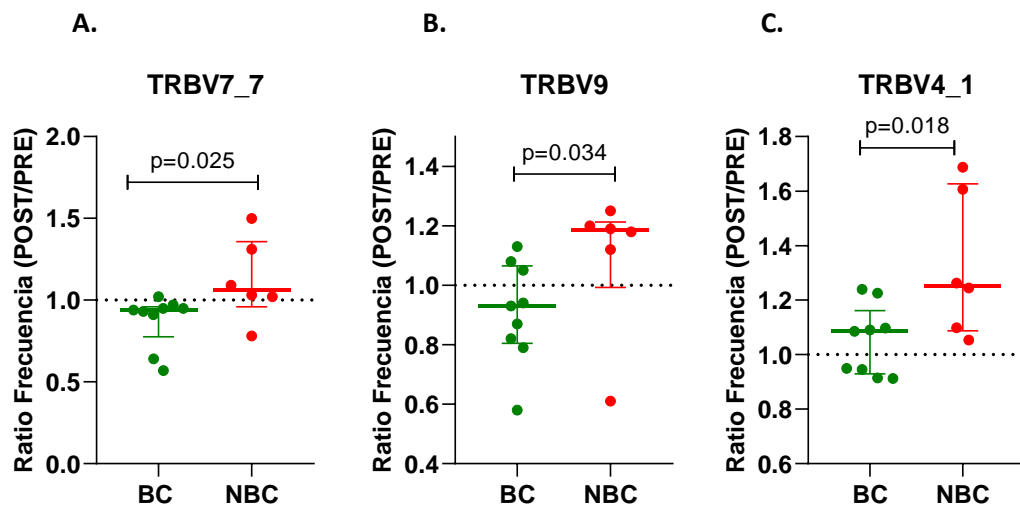


Figura 36. Dinámica de clonotipos con segmentos V según beneficio clínico a ICB. A. TRBV7_7 BC vs NBC (0,94 vs 1,06; $p=0,025$). B. TRBV9 BC vs NBC (0,93 vs 1,18; $p=0,034$). C. TRBV4_1 NBC vs BC (1,25 vs 1,09; $p=0,018$). NBC: No beneficio clínico, BC: beneficio clínico. La línea central representa la mediana y las líneas de error, el rango intercuartílico.

Estos resultados confirman que la frecuencia de ciertos clonotipos en circulación disminuyen cuando existe respuesta al tratamiento o enfermedad estable, lo cual plantea que dichos clonotipos migrarían desde la circulación al sitio tumoral para ejercer su acción antitumoral. En base a la literatura publicada, este sería el primer trabajo que evalúa el repertorio completo de segmentos V y J en sangre periférica pre y post tratamiento, y su dinámica según la respuesta al mismo.

4.6. ANÁLISIS DE SECUENCIAS CDR3 NT Y CDR3 AA QUE CONFORMAN EL REPERTORIO TCR BETA

Se analizaron exhaustivamente las secuencias de nucleótidos (CDR3NT) y aminoácidos (CDR3AA) que conforman el repertorio TCR β para cada paciente, pre y post tratamiento.

Se evaluó si existían clonotipos (CDR3NT) compartidos entre los diferentes pacientes. Además, entre las muestras pre y post tratamiento de cada paciente, se determinó el número de clonotipos CDR3NT nuevos, perdidos y conservados. Los CDR3NT nuevos, son aquellos clonotipos que no están presentes pretratamiento, pero son detectados en la muestra post tratamiento. En cambio, los CDR3NT perdidos son los presentes pretratamiento, pero no se registran post tratamiento. Mientras que los CDR3NT conservados son aquellos clonotipos que son hallados tanto pre como post tratamiento, aunque su frecuencia haya variado. Cada uno de estos grupos de clonotipos se analizaron considerando el total del repertorio y los 100 clonotipos más frecuentes (TOP100), evaluando la asociación con la respuesta al tratamiento.

Por otro lado, se analizó los clonotipos que comparten la misma secuencia de CDR3AA y segmento V pero que son codificados por diferentes secuencias CDR3NT, es decir, los clonotipos convergentes. En este caso, se evaluó para los pacientes que presentaron un marcado cambio de convergencia durante el tratamiento.

4.6.1. Clonotipos CDR3 NT

El análisis de clonotipos entre pacientes no detectó clonotipos CDR3NT compartidos entre los diferentes pacientes, tanto pre como post tratamiento. Es decir, cada paciente presentó su propio repertorio TCR β . Estos resultados están en sintonía con el estudio de Wang et, al donde comprobaron

que la tasa de similitud de clonotipos entre diferentes tejidos tumorales de pulmón era muy baja, lo cual podría indicar la heterogeneidad intratumoral del carcinoma de pulmón (Wang et al.,2019).

Con respecto al número de clonotipos nuevos, perdidos y conservados totales durante el tratamiento, no se observan diferencias significativas según la respuesta al tratamiento.

En cuanto al análisis de estos clonotipos dentro del TOP 100 se observa que los pacientes sin beneficio clínico presentan mayor número de clonotipos nuevos versus los de beneficio clínico (mediana, 18,5 vs 6, $p=0,05$) (figura 37). Para el grupo de clonotipos perdidos y conservados no se detectan diferencias significativas entre las diferentes respuestas al tratamiento.

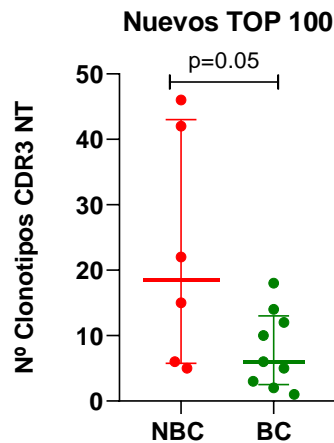


Figura 37. Clonotipos CDR3NT nuevos dentro de los 100 más frecuentes post tratamiento. NBC vs BC (18,5 vs 6, $p=0,05$). (NBC: No beneficio clínico, BC: beneficio clínico). La línea central representa la mediana y las líneas de error, el rango intercuartílico.

Estos resultados confirman que la presencia de mayor cantidad de clonotipos nuevos de alta frecuencia predispone a una respuesta antitumoral desfavorable, reflejando la posibilidad que los clonotipos recién generados no son efectivos en atacar las células tumorales. Asimismo, otros estudios han determinado que un mayor grado de conservación del repertorio de clonotipos durante el tratamiento condicionan a un mejor pronóstico (Han et al.,2020; Liu et al.,2019).

4.6.2. Clonotipos CDR3 AA

Analizando la convergencia con relación a la respuesta al tratamiento, si bien no se encontró diferencias significativas, hubo pacientes que presentaron un comportamiento extremo en cuanto a la presencia de clonotipos convergentes: el paciente 8 disminuyó la frecuencia de clones convergentes 66,86% con progresión de la enfermedad, mientras que el paciente 15 aumentó en 237,01% con una respuesta parcial al tratamiento.

El paciente 8, mencionado previamente por presentar la convergencia más alta de la cohorte, disminuye notablemente la convergencia desde 0,2192 en la muestra pretratamiento a 0,0726 en muestra postratamiento. Esta disminución se ve reflejada en la disminución de las frecuencias de algunos clonotipos como, por ejemplo, ATSRETGKETQY y ASSLASGITGELF, que son codificados cada uno por dos secuencias de nucleótidos diferentes con el mismo segmento V (tabla 6).

Tabla 6. Clonotipos convergentes del paciente 8. En la secuencia de CDR3 NT se marcan con color morado las bases correspondientes al segmento V y en rojo las del segmento J. Las bases que han cambiado están en negrita.

TRBV	TRBJ	CDR3 AA	CDR3 NT	Frecuencia PRE	Frecuencia POST
15	2-5	ATSRETGKETQY	GCCACCAGCAGAGA AACTGG AAAGAGACCCAGTAC	0,1814	0,0610
	2-5		GCCACCAGCAGAGA GACAGGG AAAGAGACCCAGTAC	0,0160	0,0080
5-1	2-2	ASSLASGITGELF	GCCAGCAGCTTGGCT AGCGGG ATACCGGGGAGCTGTTT	0,0043	6,62x10 ⁻⁵
	2-2		GCCAGCAGCTTGGCT TCA GGGATACCGGGGAGCTGTTT	5,88x10 ⁻⁴	1,64x10 ⁻⁵

En el caso contrario, la muestra pretratamiento del paciente 15 tenía en la muestra basal una convergencia de 0,0030 y aumenta marcadamente en la muestra post tratamiento a 0,0101. Se observa en la tabla 7 que el primer clonotipo CDR3 AA ASSITSGSYNEQF es codificado post tratamiento por dos secuencias de CDR3NT nuevas, además de aumentar la frecuencia del CDR3 NT existente. Mientras que el clonotipo ASEADTQY es codificado por dos secuencias de nucleótidos conservadas que aumentan su frecuencia.

Tabla 7. Clonotipos convergente del paciente 15. En la secuencia de CDR3 NT se marcan con color morado las bases correspondientes al segmento V y en rojo las del segmento J. Las bases que han cambiado están en negrita.

TRBV	TRBJ	CDR3 AA	CDR3 NT	Frecuencia PRE	Frecuencia POST
19	2-1	ASSITSGSYNEQF	GCCAGTAGTATA AACTAGCG TTCTACAATGAGCAGTTC	2,18x10 ⁻⁴	0,0010
	2-1		GCCAGTAGTATA CTACTAGCGG AGCTACAATGAGCAGTTC	0	7,71x10 ⁻⁵
	2-1		GCCAGTAGTATA CACTAGCGG CTCTACAATGAGCAGTTC	0	6,95x10 ⁻⁵
19	2-3	ASEADTQY	GCCTCA GAGGCAGATACGCAGTAT	9,53x10 ⁻⁵	6,57x10 ⁻⁴
	2-3		GCCAGT GAGGCAGATACGCAGTAT	1,89x10 ⁻⁴	4,62x10 ⁻⁴

Al momento no hay trabajos que evalúen los cambios de la convergencia durante el tratamiento ni la composición de CDR3 AA y CDR3NT de los clonotipos convergentes.

En resumen, este trabajo es el primero en analizar detalladamente el repertorio de TCR β periférico en pacientes con CPNM en estadios avanzados tratados con anti-PD-1, Pembrolizumab. Nuestros resultados demuestran la influencia negativa del envejecimiento y el hábito tabáquico sobre dicho repertorio, predisponiendo a una menor capacidad antitumoral por parte del sistema inmune.

Asimismo, queda demostrado que el repertorio de TCR β varía en el transcurso del tratamiento. En el mejor escenario, se propone una mayor riqueza y diversidad de TCR β previo al tratamiento para poder reconocer el amplio espectro de antígenos tumorales y que aquellos clonotipos con TCRs específicos sean reactivados y expandidos por la acción del ICB.

Además, el aumento de secuencias diferentes de CDR3NT que codifican para la misma secuencia de aminoácidos que interacciona con el antígeno, sugiere que la especificidad de ese TCR es clave para el reconocimiento de un antígeno tumoral.

La baja frecuencia pretratamiento de clonotipos compuestos con un determinado segmento, como **TRBV7_4** consigue una respuesta favorable y un mayor supervivencia libre de progresión.

Por otro lado, la disminución en la frecuencia de clonotipos compuestos con determinados segmentos V y J en sangre periférica, propone la migración de estos al tejido tumoral pulmonar para ejercer su acción antitumoral. Los clonotipos con TCR compuestos con segmentos **TRBV6_1**, **TRBV6_4**,

TRBV7_7, TRBV9 y TRBJ2_6, serían específicos de antígenos tumorales, ya que disminuyen en pacientes que experimentan respuesta parcial o enfermedad estable.

En cuanto a la presencia de mayor cantidad de clonotipos nuevos de alta frecuencia condiciona a una respuesta antitumoral desfavorable.

En la figura 38 se intenta resumir los resultados previamente mencionados.

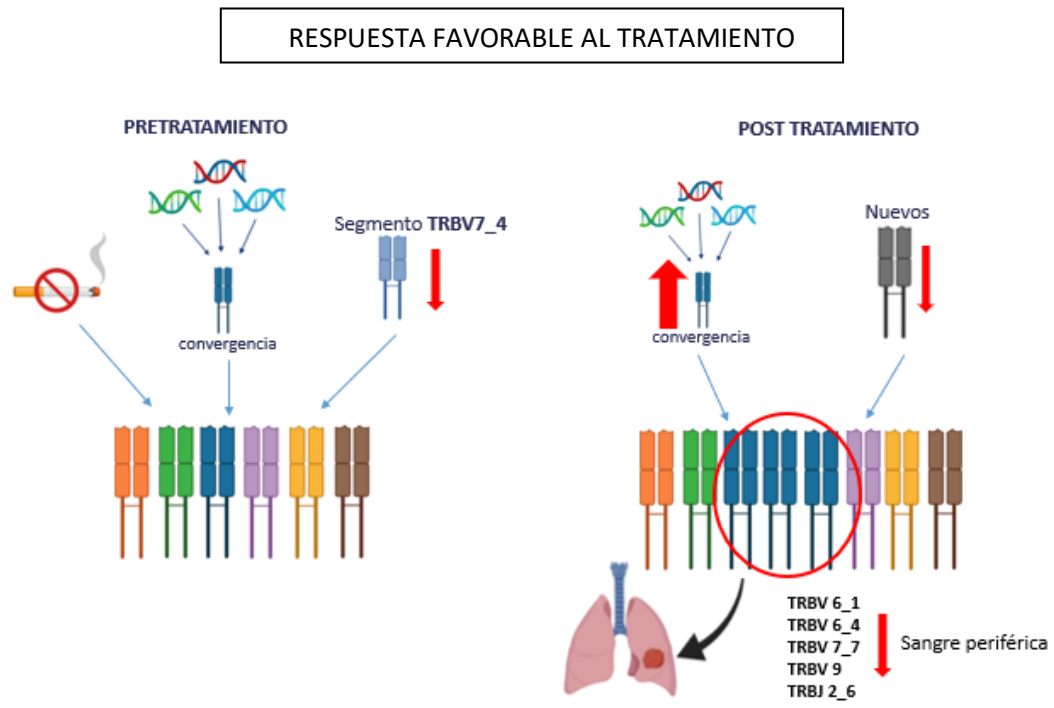


Figura 38. Características del repertorio TCR de sangre periférica pre y post tratamiento en una respuesta favorable.

Sin embargo, este trabajo tiene limitaciones debido al reducido tamaño muestral, por lo tanto, estos análisis deberían ser validados en una cohorte mayor. Además, se podría aumentar la sensibilidad tras “seleccionar” a los linfocitos periféricos que puedan estar implicados en el reconocimientos de antígenos específicos de tumor, para lo cual, sería efectivo aislar de PBMC a los linfocitos CD8+ PD-1 + por citometría de flujo. Sin embargo, esta estrategia no asegura que todos los linfocitos estén involucrados en la respuesta antitumoral, por ello, también sería conveniente tomar muestras pareadas de tejido tumoral para evaluar TIL (linfocitos infiltrantes de tumor) y compararlos con los de sangre periférica, aunque esto condiciona a someter al paciente a una técnica invasiva y la limitación de la disponibilidad de muestra de tejido.

En base a los resultados obtenidos en este estudio se amplía el conocimiento en esta área para seguir considerando al repertorio TCR β como un posible biomarcador predictivo a ICB.

5. CONCLUSIONES

- 1.** La secuenciación por NGS de la región CDR3 de la cadena β del TCR a partir de linfocitos de sangre periférica de pacientes tratados con ICB fue satisfactoria, logrando una buena caracterización del repertorio inmune en la cohorte del estudio.
- 2.** Los datos de secuenciación permitieron la determinación de los índices de riqueza, diversidad, clonalidad y convergencia, así como la composición de segmentos VDJ para todas las muestras debido a la buena calidad de las lecturas obtenidas. Los valores de los índices fueron homogéneos para todas las muestras, detectando una mediana de 32.937 y 30.903 TCRs diferentes, pre y post tratamiento, respectivamente.
- 3.** El análisis de las características del repertorio de TCRs con las variables clínico-patológicas demostró que:
 - ✓ Según la edad: los pacientes mayores de 60 años presentan mayor convergencia y menor diversidad en las muestras basales, lo que puede deberse a la senescencia del sistema inmune en este subgrupo poblacional.
 - ✓ Según el hábito tabáquico: Los pacientes fumadores presentan menor riqueza y diversidad pretratamiento comparados con que los nunca o exfumadores.
 - ✓ Según respuesta al tratamiento: no se observaron diferencias significativas para los índices analizados y la respuesta a ICB. Sin embargo, la frecuencia de determinados clonotipos, así como el número de clonotipos nuevos, permite identificar a pacientes que progresaron tras el tratamiento administrado.
- 4.1.** Los índices del repertorio TCR (riqueza, diversidad, clonalidad, convergencia) pre y post tratamiento no se correlacionan con variables pronósticas (SLP o SG).
- 4.2.** Los pacientes con mayor SLP presentaron una menor frecuencia de clonotipos con segmento TRBV7-4 pretratamiento, favoreciendo la selección de pacientes que tendrán un mejor curso clínico tras el tratamiento con ICB.
- 5.** La dinámica de la variación del repertorio TCR reveló un patrón de aumento de clonalidad en pacientes respondedores, mientras que la frecuencia de clonotipos compuestos con segmentos TRBV6_1, TRBV6_4 TRBV7_7, TRBV9 y TRBJ2_6 disminuye tras el tratamiento en los pacientes con respuesta parcial o enfermedad estable.
- 6.** Una visión integral de los resultados permite posicionar al análisis del repertorio TCR como un marcador útil para la selección de pacientes con CPNM tratados con ICB, aunque la información debería complementarse con otras variables relacionadas a características inmunogénicas del tumor. Se requieren estudios adicionales en una cohorte de pacientes más extensa para establecer el papel de las variables únicas o combinadas como biomarcadores inmuno-relacionados en CPNM.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H. & PILLAI SHIV. (2012a). Inmunidad antitumoral en *Inmunología celular y molecular*. Elsevier (Séptima),389-405
- ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H. & PILLAI SHIV. (2012b). Receptores inmunitarios y transducción de señales en *Inmunología celular y molecular*. Elsevier (Séptima),139-171
- ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H. & PILLAI SHIV. (2012c). Desarrollo del linfocito y reordenamiento del gen del receptor para el antígeno en *Inmunología celular y molecular*. Elsevier (Séptima),139-171
- ANAGNOSTOU, V.; FORDE, P. M.; WHITE, J. R.; NIKNAFS, N.; HRUBAN, C.; NAIDOO, J.;... & VELCULESCU, V. E. (2019). Dynamics of tumor and immune responses during immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer. *Cancer Research*, 79(6), 1214–1225.
- ATTAF, M.; HUSEBY, E. & SEWELL, A. K. (2015). $\alpha\beta$ T cell receptors as predictors of health and disease. *Cellular and Molecular Immunology*, 12(4), 391–399.
- AVERSA, I.; MALANGA, D.; FIUME, G. & PALMIERI, C. (2020). Molecular T-Cell Repertoire Analysis as Source of Prognostic and Predictive Biomarkers for Checkpoint Blockade Immunotherapy. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2378.
- BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A. & JEMAL, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
- BRITANOVA, O. V.; PUTINTSEVA, E. V.; SHUGAY, M.; MERZLYAK, E. M.; TURCHANINOVA, M. A.; STAROVEROV, D. B.; ...& CHUDAKOV, D. M. (2014). Age-Related Decrease in TCR Repertoire Diversity Measured with Deep and Normalized Sequence Profiling. *The Journal of Immunology*, 192(6), 2689–2698.
- CHEN, D. S. & MELLMAN, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39(1), 1-10.
- CHEN, D. S. & MELLMAN, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*, 541(7637), 321–330.
- CHEN, L. & FLIES, D. B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*, 13(4), 227-242.
- COULIE, P. G.; VAN DEN EYNDE, B.; VAN DER BRUGGEN, P. & BOON, T. (2014). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 14(2), 135-146.
- COURAUD, S.; ZALCMAN, G.; MILLERON, B.; MORIN, F. & SOUQUET, P. J. (2012). Lung cancer in never smokers - A review. *European Journal of Cancer*, 48(9), 1299–1311.
- DAGENAIS, G. R.; LEONG, D. P.; RANGARAJAN, S.; LANAS, F.; LOPEZ-JARAMILLO, P.; GUPTA, R.; ... & PARAMBATH, S. R. (2020). Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *The Lancet*, 395(10226), 785-794.
- DE GROOT, P. & MUNDEN, R. F. (2012). Lung cancer epidemiology, risk factors, and prevention. *Radiologic Clinics*, 50(5), 863-876.
- DETERBECK, F. C.; BOFFA, D. J.; KIM, A. W. & TANOUE, L. T. (2017). The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. *Chest*, 151(1), 193–203.

- DONG, H.; STROME, S. E.; SALOMAO, D. R.; TAMURA, H.; HIRANO, F.; FLIES, D. B.; ... & LENNON, V. A. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature medicine*, 8(8), 793-800.
- DUNN, G.; OLD, L. & SCHREIBER, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21(2), 137-148.
- ETTINGER, D. S.; AISNER, D. L.; WOOD, D. E.; AKERLEY, W.; BAUMAN, J.; CHANG, J. Y.; ... & HUGHES, M. (2018). NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 5.2018. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, 16(7), 807–821.
- GAJEWSKI, T. F.; SCHREIBER, H. & FU, Y. X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature immunology*, 14(10), 1014-1022.
- GIBNEY, G. T.; WEINER, L. M. & ATKINS, M. B. (2016). Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *The Lancet Oncology*, 17(12), e542–e551.
- GOLDSTRAW, P.; BALL, D.; JETT, J. R.; LE CHEVALIER, T.; LIM, E.; NICHOLSON, A. G. & SHEPHERD, F. A. (2011). Non-small-cell lung cancer. *Lancet*, 378(9804), 1727–1740.
- GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D. & MCCOMBIE, W. R. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333–351.
- GRIDELLI, C.; ROSSI, A.; CARBONE, D. P.; GUARIZE, J.; KARACHALIOU, N.; MOK, T.; ... & ROSELL, R. (2015). Non-small-cell lung cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 1–16.
- HAN, J.; DUAN, J.; BAI, H.; WANG, Y.; WAN, R.; WANG, X.; ... & WANG, J. (2020). TCR repertoire diversity of peripheral PD-1⁺CD8⁺ T cells predicts clinical outcomes after immunotherapy in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunology Research*, 8(1), 146–154.
- HANAHAH, D. & WEINBERG, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.
- HANAHAH, D. & WEINBERG, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- HAVEL, J. J.; CHOWELL, D. & CHAN, T. A. (2019). The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 19(3), 133–150.
- HEID, C.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J. & WILLIAMS, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986–994.
- HEITZER, E.; HAQUE, I. S.; ROBERTS, C. & SPEICHER, M. R. (2019). Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nature reviews. Genetics*, 20(2), 71–88.
- HODI, F. S.; O'DAY, S. J.; MCDERMOTT, D. F.; WEBER, R. W.; SOSMAN, J. A.; HAANEN, J. B., ... & AKERLEY, W. (2010). Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 363(13), 711–723.
- HOPKINS, A. C.; YARCHOAN, M.; DURHAM, J. N.; YUSKO, E. C.; RYTLEWSKI, J. A.; ROBINS, H. S.; ... & JAFFEE, E. M. (2018). T cell receptor repertoire features associated with survival in immunotherapy-treated pancreatic ductal adenocarcinoma. *JCI Insight*, 3(13), 1–10.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH, GLOBOCAN, Global Cancer Observatory (2020). Cancer today. Consultado 6 de mayo de 2020. Disponible <https://gco.iarc.fr/today/home>
- JANTUS-LEWINTRE, E., & USÓ, M. (2015). Heterogeneidad celular en el tumor y el estroma: De los fibroblastos asociados al cáncer a los linfocitos T reguladores y otros infiltrados inmunológicos con capacidad inmunomoduladora. Aplicabilidad terapéutica actual y futura. En *Inmunoterapia del cáncer. Realidades y perspectivas*. Barcelona: Elsevier.
- KIM, J. M. & CHEN, D. S. (2016). Immune escape to PD-L1/PD-1 blockade: seven steps to success (or failure). *Annals of Oncology*, 27(8), 1492-1504.

- KIM, K. H.; CHO, J.; KU, B. M.; KOH, J.; SUN, J. M.; LEE, S. H.;...& SHIN, E. C. (2019). The first-week proliferative response of peripheral blood PD-1 β CD8 β T cells predicts the response to Anti-PD-1 therapy in solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 25(7), 2144–2154.
- LEE, Y. N. (2016). TCR Repertoire Analysis. En *Translational Immunology: Mechanisms and Pharmacologic Approaches*. Elsevier Inc.,115-129
- LESTERHUIS, W. J.; BOSCO, A.; MILLWARD, M. J.; SMALL, M.; NOWAK, A. K. & LAKE, R. A. (2017). Dynamic versus static biomarkers in cancer immune checkpoint blockade: unravelling complexity. *Nature reviews. Drug discovery*, 16(4), 264–272.
- LIU, Y. Y.; YANG, Q. F.; YANG, J. S.; CAO, R. B.; LIANG, J. Y.; LIU, Y. T.;... & LIU, L. (2019). Characteristics and prognostic significance of profiling the peripheral blood T-cell receptor repertoire in patients with advanced lung cancer. *International Journal of Cancer*, 145(5), 1423–1431.
- LOONEY, T. J.;TOPACIO-HALL, D.; LOWMAN, G.; CONROY, J.; MORRISON, C.; OH, D.; ...& ZHANG, L. (2020). TCR Convergence in Individuals Treated With Immune Checkpoint Inhibition for Cancer. *Frontiers in Immunology*, 10, 2985.
- MARCUS, L.; LEMERY, S. J.; KEEGAN, P. & PAZDUR, R. (2019). FDA approval summary: Pembrolizumab for the treatment of microsatellite instability-high solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 25(13), 3753–3758.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, OMS, (2020). Temas de salud. Cáncer. Consultado 5 de mayo 2020 Disponible: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- PATEL, S. P. & KURZROCK, R. (2015). PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(4), 847–856.
- POSTOW, M. A.; MANUEL, M.; WONG, P.; YUAN, J.; DONG, Z.; LIU, C.;...& WOLCHOK, J. D. (2015). Peripheral T cell receptor diversity is associated with clinical outcomes following ipilimumab treatment in metastatic melanoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 3(1), 3–7.
- QUAIL, D. F. & JOYCE, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine*, 19(11), 1423-1437.
- RIBAS, A. (2012). Tumor Immunotherapy Directed at PD-1. *The New England Journal of Medicine*, 2517–2519.
- ROTHBERG, J. M.; HINZ, W.;REARICK, T. M.; SCHULTZ, J.; MILESKI, W.; DAVEY, M.; ... &BUSTILLO, J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 475(7356), 348–352.
- RUDD, C. E.; TAYLOR, A. & SCHNEIDER, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunological reviews*, 229(1), 12-26.
- SCHROEDER, A.; MUELLER, O.; STOCKER, S.; SALOWSKY, R.; LEIBER, M.; GASSMANN, M.;... & RAGG, T. (2006). The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, 7, 1–14.
- SHARMA, P.; HU-LIESKOVAN, S.; WARGO, J. A. & RIBAS, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*, 168(4), 707–723.
- TESTA, U.; CASTELLI, G. & PELOSI, E. (2018). Lung cancers: Molecular characterization, clonal heterogeneity and evolution, and cancer stem cells. *Cancers*, 10(8), 1–81.
- TRAVIS W. D. (2020). Lung Cancer Pathology: Current Concepts. *Clinics in chest medicine*, 41(1), 67–85.
- WANG, X.; ZHANG, B.; YANG, Y.; ZHU, J.; CHENG, S.; MAO, Y.; ...& XIAO, T. (2019). Characterization of Distinct T Cell Receptor Repertoires in Tumor and Distant Non-tumor Tissues from Lung Cancer Patients. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 17(3), 287–296.

WANG, Z.; DUAN, J.; CAI, S.; HAN, M.; DONG, H.; ZHAO, J.; ...& WANG, J. (2019). Assessment of Blood Tumor Mutational Burden as a Potential Biomarker for Immunotherapy in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer with Use of a Next-Generation Sequencing Cancer Gene Panel. *JAMA Oncology*, 5(5), 696–702.

WU, T. D.; MADIREDDI, S.; DE ALMEIDA, P. E.; BANCHEREAU, R.; CHEN, Y. J.; CHITRE, A. S.; ...& GROGAN, J. L. (2020). Peripheral T cell expansion predicts tumour infiltration and clinical response. *Nature*, 579(7798), 274–278.

WU, X.; GU, Z.; CHEN, Y.; CHEN, B.; CHEN, W.; WENG, L. & LIU, X. (2019). Application of PD-1 blockade in cancer immunotherapy. *Computational and structural biotechnology journal*, 17, 661-674.

ZHANG, J.; JI, Z.; CAUSHI, J. X.; EL ASMAR, M.; ANAGNOSTOU, V.; COTTRELL, T. R.; ... & SMITH, K. N. (2020). Compartmental analysis of T-Cell clonal dynamics as a function of pathologic response to neoadjuvant PD-1 blockade in resectable non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 26(6), 1327–1337.

7. ANEXOS

7.1. GRÁFICAS SUPLEMENTARIAS

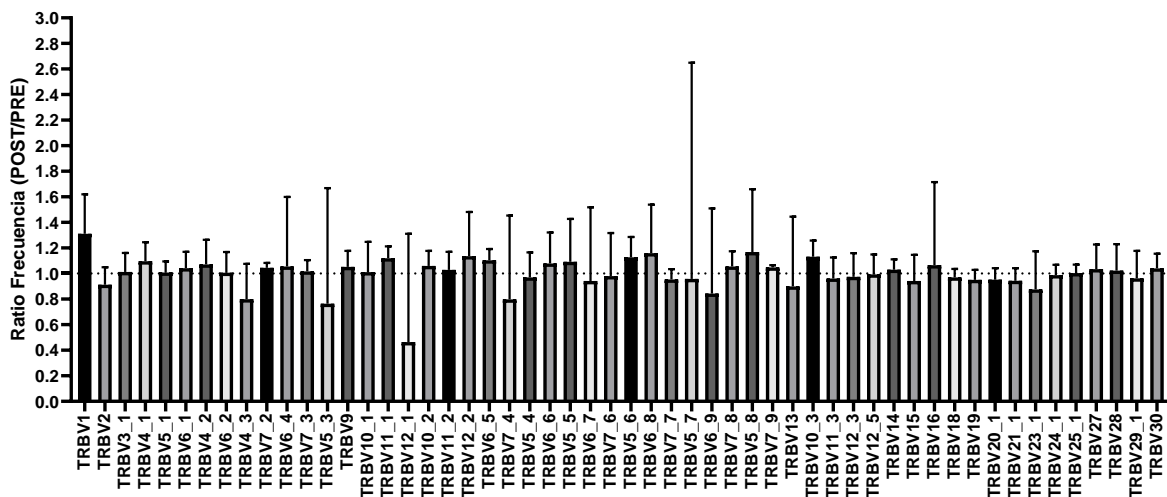


Figura S1. Ratio frecuencias (POST/PRE) segmentos V. La altura de cada barra representa la mediana del ratio de frecuencia y las barras de error, el rango intercuartílico.

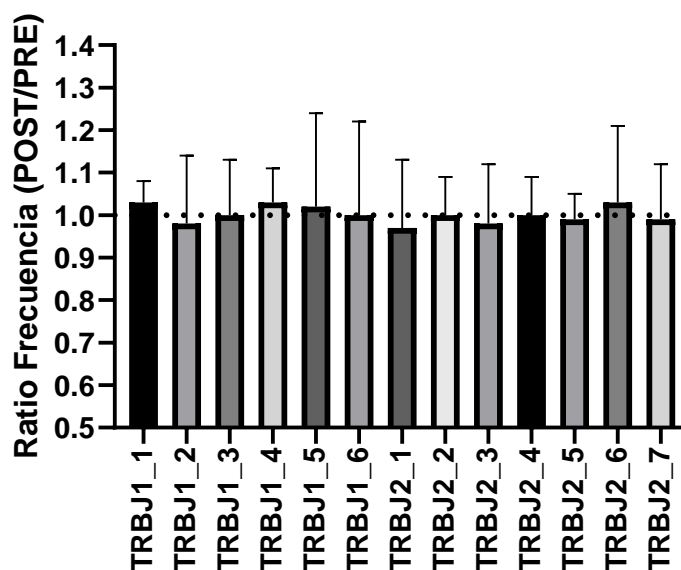


Figura S2. Ratio frecuencias (POST/PRE) segmentos J. La altura de cada barra representa la mediana del ratio de frecuencia y las barras de error, el rango intercuartílico.

7.2. TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla S1. Descriptores T, N y M para la 8ª edición de la clasificación TNM del Cáncer de Pulmón (Detterbeck et al ,2017).

T: Tumor primario	
Tx	El tumor primario no puede ser evaluado o es evidenciado por la presencia de células malignas en esputo o lavados bronquiales, pero no mediante pruebas de imagen o broncoscopia.
T0	Sin evidencia de tumor primario.
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor < o igual a 3 cm en su diámetro mayor rodeado por pulmón o pleura visceral sin evidencia mediante broncoscopia de invasión más proximal que el bronquio lobular
T1a(mi)	Adenocarcinoma mínimamente invasivo. b
T1a	Tumor < o igual a 1 cm en su diámetro mayor.
T1b	Tumor > 1 cm, pero < o igual a 2 cm en su diámetro mayor.
T1c	Tumor > 2 cm, pero < o igual a 3 cm en su diámetro mayor. c
T2	Tumor > 3 cm, pero < o igual a 5 cm o tumor con alguno de los siguientes criterios c: - Afecta bronquio principal independientemente de la distancia desde carina pero sin afectarla. - Invade pleura visceral. - Asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hiliar, afectando una parte o todo el pulmón
T2a	Tumor > 3 cm, pero < o igual a 4 cm en su diámetro mayor.
T2b	Tumor > 4 cm, pero < o igual a 5 cm en su diámetro mayor.
T3	Tumor > 5 cm, pero < o igual a 7 cm en su diámetro mayor o con nódulos tumorales en el mismo lóbulo que el tumor primario o que invade directamente alguna de las siguientes estructuras: pared torácica (incluyendo pleura parietal y tumores del surcu superior), nervio frénico, pericardio parietal.
T4	Tumor > 7 cm en su lado más grande o asociado a nódulo(s) tumorales separados en un lóbulo ipsilateral diferente al del tumor primario o directamente invade alguna de las siguientes estructuras: diafragma, mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpo vertebral y carina.
N: Afectación de ganglios linfáticos regionales.	
Nx	No se puede evaluar la afectación de los ganglios linfáticos regionales
N0	No existe afectación de ganglios linfáticos regionales.
N1	Metástasis en ganglios linfáticos peribronquiales y/o hilares e intrapulmonares ipsilaterales. Incluyendo afectación por extensión directa.
N2	Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos ipsilaterales y/o subcarinales
N3	Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos contralaterales, hilares contralaterales, escalénicos o supraclaviculares ipsilaterales o contralaterales.
M: metástasis a distancia	
M0	No existen metástasis a distancia
M1	Presencia de metástasis a distancia.
M1a	Nódulos tumorales presentes en lóbulo contralateral; tumor con nódulos pleurales o pericárdicos; derrame pleural o pericárdico malignos. d
M1b	Metástasis única extratorácica. e
M1c	Metástasis múltiples extratorácicas en uno o varios órganos.
<p>a. El infrecuente tumor de cualquier tamaño que invade superficialmente con su componente invasivo limitado a la pared bronquial, que puede extenderse proximalmente al bronquio principal, también es clasificado como T1a.</p> <p>b. Adenocarcinoma solitario de 3 cm o menos con un predominante componente lepidico y 5 mm o menos de invasión en cualquier foco.</p> <p>c. Los tumores T2 con estas características se clasifican como T2a si son de 4 cm o menos en su diámetro mayor o si el tamaño no puede determinarse, y como T2b si son > 4 cm, pero menores o iguales a 5 cm en su diámetro mayor.</p> <p>d. La mayoría de los derrames pleurales (pericárdicos) con cáncer de pulmón son debidos al tumor. En pocos pacientes, sin embargo, múltiples exámenes del líquido pleural (pericárdico) son negativos para células neoplásicas y el líquido no es hemático ni un exudado. Cuando estos aspectos y el juicio clínico concluyen que el derrame no se relaciona con el tumor, el derrame debería ser excluido como descriptor de estadificación.</p> <p>e. Esto incluye la afectación de un único ganglio no regional</p>	

Tabla S2. Estadificación del cáncer de pulmón, TNM 8ª edición (Detterbeck et al ,2017)

Estadio	T	N	M
Carcinoma oculto	TX	N0	M0
0	Tis	N0	M0
IA1	T1a(mi)/T1a	N0	M0
IA2	T1b	N0	M0
IA3	T1c	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
IIB	T1a-T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1a-T2b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0/N1	M0
IIIB	T1a-T2b	N3	M0
	T3/T4	N2	M0
IIIC	T3/T4	N3	M0
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a/M1b
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1c

Tabla S3. Características demográficas de cada uno de los pacientes

PACIENTE	EDAD	SEXO	HÁBITO TABAQUICO
P1	57	Hombre	FUMADOR
P2	64	Hombre	FUMADOR
P3	63	Hombre	FUMADOR
P4	69	Hombre	FUMADOR
P5	62	Hombre	FUMADOR
P6	84	Mujer	NUNCA FUMADOR
P7	73	Hombre	FUMADOR
P8	63	Hombre	FUMADOR
P9	65	Mujer	FUMADOR
P10	55	Hombre	FUMADOR
P11	82	Hombre	EX FUMADOR
P12	55	Hombre	EX FUMADOR
P13	51	Mujer	NUNCA FUMADOR
P14	69	Hombre	EX FUMADOR
P15	59	Mujer	FUMADOR

Tabla S4. Características clinicopatológicas de cada uno de los pacientes.

P	HISTOLOGÍA	PD-L1%	ESTADIO	R	CRITERIO DE RESPUESTA	BENEFICIO CLÍNICO	EXITUS	SLP (meses)	SG (meses)
P1	ADC	90	IVb	PE	NR	NO	NO	1,8	10,2
P2	ADC	80	IVa	EE	NR	SI	NO	8,9	8,9
P3	ADC	60	IVb	RP	R	SI	NO	7,8	7,8
P4	ADC	90	IVb	PE	NR	NO	NO	2,7	9,1
P5	ADC	70	IVa	EE	NR	SI	NO	10,0	10,0
P6	otros	80	IVb	PE	NR	NO	NO	1,9	8,9
P7	ADC	100	IVb	RP	R	SI	NO	9,7	9,7
P8	ADC	70	IVb	PE	NR	NO	SI	2,8	5,9
P9	ADC	70	IVb	PE	NR	NO	NO	1,4	7,4
P10	ADC	100	IVb	RP	R	SI	NO	5,9	5,9
P11	ADC	95	IIIb	RP	R	SI	NO	6,9	6,9
P12	Escamoso	90	IIIb	EE	NR	SI	NO	7,9	7,9
P13	ADC	-	Iva	EE	NR	SI	NO	4,1	4,1
P14	ADC	90	IVb	PE	NR	NO	NO	2,9	4,7
P15	ADC	90	IVb	RP	R	SI	NO	5,1	5,1

P: Paciente R: Respuesta ADC: Adenocarcinoma PE: Progresión enfermedad EE: Enfermedad Estable RP: Respuesta Parcial NR: No Respondedores R: Respondedores SLP: Supervivencia Libre de Progresión SG: Supervivencia Global.

Tabla S5. Métricas de calidad de las carreras de secuenciación

	PARÁMETROS	CARRERAS en Chip 530			VALORES ÓPTIMOS
		1	2	3	
CLASIFICACIÓN POCILLOS	Carga ISP (%)	94	93	93	90
	Enriquecimiento ISP (%)	100	100	100	90-100
FILTROS LIBRERIAS	ISP Policlonal (%)	34	34	36	30-40
	Baja Calidad (%)	8	12	11	12
	Dímero de Adaptadores (%)	5	4	5	8
LECTURAS FILTRADAS	Lecturas Utilizable Totales	19.904.675	19.138.504	18.820.505	15-20 M
	Lecturas Utilizables Totales (%)	57	55	54	50-60
	Longitud Lectura Media (pb)	86	88	88	80