



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Departamento de Medicina

Facultad de Medicina y Odontología

Programa de Doctorado en Medicina

**IDENTIFICACIÓN DE TCRs REACTIVOS CONTRA
NEOANTÍGENOS TUMORALES EN MUESTRAS DE
PACIENTES CON CPNM MEDIANTE
SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN.
IMPLICACIONES PRONÓSTICAS Y TERAPÉUTICAS.**

TESIS DOCTORAL presentada por:

Ning Dong

Directores:

Dr. Carlos Camps Herrero

Dra. Eloísa Jantus-Lewintre

Valencia 2021



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA



CARLOS CAMPS HERRERO, Dr. por la Universitat de València, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universitat de València y Jefe del Servicio de Oncología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

CERTIFICA:

Que Dña. Ning Dong, Licenciada en Medicina, ha realizado bajo mi dirección la Tesis Doctoral que lleva por título **“Identificación de TCRs reactivos contra neoantígenos tumorales en muestras de pacientes con CPNM mediante secuenciación de nueva generación. Implicaciones pronósticas y terapéuticas.”** Dicha tesis reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación para optar al título de Doctor por la Universitat de València.

Valencia, 12 de julio de 2021.



Prof. Carlos Camps
Catedrático de Medicina
Facultad de Medicina
Universitat de València

Prof. Carlos Camps Herrero

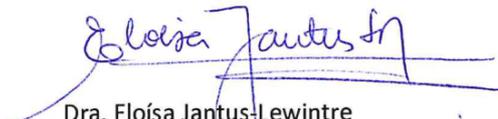
D.N.I.: 22517012N

ELOÍSA JANTUS-LEWINTRE, Dra. por la Universitat de València, Jefa del Laboratorio de Oncología Molecular de la Fundación del Hospital General Universitario de Valencia y Profesora Titular del Departamento de Biotecnología de la Universitat Politècnica de Valencia.

CERTIFICA:

Que Dña. Ning Dong, Licenciada en Medicina, ha realizado bajo mi dirección la Tesis Doctoral que lleva por título **“Identificación de TCRs reactivos contra neoantígenos tumorales en muestras de pacientes con CPNM mediante secuenciación de nueva generación. Implicaciones pronósticas y terapéuticas.”** Dicha tesis reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación para optar al título de Doctor por la Universitat de València.

Valencia, 12 de julio de 2021.


Dra. Eloísa Jantus-Lewintre
D.N.I: 24474835Y

AGRADECIMIENTOS

El tiempo vuela y el estudio de doctorado ha llegado a su fin. En este pequeño espacio me gustaría expresar mis agradecimientos a todas las personas que me han apoyado y acompañado durante estos años, sin ellos no podría tener esta tesis doctoral.

En primer lugar, quiero dar las gracias más sinceras a mis directores, Dr. Carlos Camps y Dra. Eloísa Jantus.

Al Dr. Carlos Camps, por permitirme formar parte de su gran grupo de investigación y brindarme un ambiente de aprendizaje y trabajo tan bueno en el Laboratorio de Oncología Molecular de la Fundación de Investigación del Hospital General Universitario de Valencia. Un personaje excelente, no solo a nivel científico sino también a nivel humano.

A la Dra. Eloísa Jantus, por su conocimiento y sus consejos, que me han apoyado en la investigación durante estos años. Gracias por mostrarme siempre los otros puntos de vista y opciones posibles en los más diversos ámbitos, y porque sin su ayuda y apoyo esta tesis sería imposible de completar con éxito.

A la Dra. Silvia Calabuig y la Dra. Macarena Ferrero, por su apoyo incondicional, por aclararme todas las dudas y animarme en los momentos de ansiedad. Gracias por guiarme en cada una de las etapas de este proyecto para alcanzar los resultados que buscaba.

A todos los compañeros del Laboratorio de Oncología Molecular, por su colaboración, compartir sus experiencias y hacer el ambiente de trabajo con alegría. A Sandra, Marais y Eva, por ser mis guías en el laboratorio y por sus enseñanzas. A Andrea y Antolina, mis compañeras de NGS, por acompañarme en los momentos más difíciles y por la buena energía. A Alejandro, Elena, Susana, Franklin, Héctor, Sara, Valentina y Mariluz, por ayudarme siempre y compartir tantos buenos ratos juntos.

A todos los médicos, residentes, data managers y enfermeras del Servicio de Oncología Médica del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, por su dedicación e importante cooperación. Gracias también a los pacientes que donaron voluntariamente

muestras biológicas para la investigación. No hubiese podido tener este proyecto de no haber sido por su incorporación.

Al Programa China Scholarship Council (CSC) por brindarme sus becas ofertadas para los estudiantes chinos para estudiar en el extranjero.

Finalmente me gustaría agradecer especialmente a mis familiares. A mis padres, por darme todo el apoyo posible, por confiar en mí y por su amor. A Feiyu, por estos años juntos, en Cuba, en España y en China, y por iluminarme en los momentos más oscuros. Tener ustedes a mi lado me hace sentir muy feliz, aunque el camino ha sido duro.

¡Muchas gracias a todos! ¡Moltes gràcies a tots! 谢谢你们!

Resumen

A pesar del éxito de la inmunoterapia en el cáncer de pulmón, el porcentaje de pacientes que se beneficia de este tipo de tratamiento sigue siendo inferior al 30%, por lo que aún es necesario el desarrollo de nuevos biomarcadores para una mejor selección de los pacientes. El objetivo del presente estudio es caracterizar el repertorio de la cadena beta del receptor de células T (TCR- β) en sangre periférica y correlacionarlo con el curso clínico en una cohorte de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) avanzado tratados con bloqueantes del eje PD-1/PD-L1 en primera línea. Para ello se analizaron muestras de linfocitos obtenidos en dos momentos: i) pretratamiento (PRE) y ii) en el momento de la primera evaluación de respuesta (1E). Se secuenció la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) del TCR- β en dichas muestras mediante secuenciación de nueva generación (NGS). Características del repertorio de TCR- β periférico tales como riqueza, equidad, convergencia, índice de similitud de Jaccard y la frecuencia de los segmentos variable (V), de diversidad (D) y de unión (J), se correlacionaron con variables clínico-patológicas y pronósticas de la cohorte en estudio. Los resultados indicaron que los pacientes fumadores tenían menor riqueza que los no fumadores ($p= 0,040$). Con respecto a la dinámica de TCR- β durante el tratamiento de inmunoterapia, el aumento de la riqueza se asoció con un beneficio clínico duradero (BCD; $p= 0,046$), supervivencia libre de progresión (SLP; $p= 0,007$) y supervivencia global (SG; $p= 0,05$) más prolongadas. Además, los pacientes con mayor índice de similitud de Jaccard entre las muestras PRE y 1E mostraron una SLP más prolongada ($p= 0,021$). Según nuestros resultados, una elevada frecuencia del uso de fragmentos TRBV20-1 PRE se asoció con BCD ($p= 0,027$). En línea con estos resultados, el grupo de pacientes con niveles mayores de TRBV20-1 tanto en la muestra PRE como 1E mostró una asociación estadísticamente significativa con una SLP y SG más prolongadas. En conclusión, durante el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral, se ha demostrado que el análisis del repertorio de TCR- β en muestras de sangre periférica puede proporcionar información importante sobre la respuesta inmune en pacientes con CPNM avanzado tratados con anti-PD-1, además de aportar información pronóstica relevante posicionándose como un posible biomarcador en este contexto clínico.

Abstract

Despite the success of immunotherapies in lung cancer, the percentage of patients that benefit from this type of therapy is still less than 30%, so the developments of new biomarkers for patient selection continue to be needed. The aim of the present study is to characterize the T cell receptor beta chain (TCR- β) repertoire in peripheral blood and to correlate with the clinical outcomes in a cohort of patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) treated with first-line PD-1/PD-L1 blockers. Lymphocyte samples were obtained at two time points: i) pretreatment (PRE) and ii) first response assessment (FR). Next-generation sequencing (NGS) was used to analyze the hypervariable complementary determining region 3 (CDR3) of TCR- β chain. Characteristics of the peripheral TCR- β repertoire, such as richness, evenness, convergence, Jaccard similarity indexes plus variable (V), diversity (D) and joining (J)-gene usage were studied and correlated with clinicopathological and prognostic variables. Our results revealed that the group of smoking patients had less richness of the TCR- β repertoire than non-smokers ($p= 0.040$). According to the TCR- β dynamics during immunotherapy, increased richness was associated with durable clinical benefit (DCB; $p= 0.046$), improved progression-free survival (PFS; $p= 0.007$) and overall survival (OS; $p= 0.05$). In addition, patients with higher Jaccard similarity index between PRE and FR samples showed longer PFS ($p= 0.021$). Furthermore, a high frequency of TRBV20-1 PRE usage was associated with DCB ($p= 0.027$). In line with these results, the group of patients with higher levels of TRBV20-1 in both PRE and FR samples showed a statistically significant association with increased PFS and OS. Overall, the results presented in this doctoral thesis showed that the analysis of circulating TCR- β repertoire can provide information about the immune response in anti-PD-1 treated NSCLC patients; in this scenario, it can also offer relevant prognostic information.

Resum

Malgrat l'èxit de la immunoteràpia al càncer de pulmó, el percentatge de pacients que es beneficia d'aquest tipus de tractament continua sent inferior al 30%, per la qual cosa encara és necessari el desenvolupament de nous biomarcadors per a una millor selecció d'aquests pacients. L'objectiu del present estudi és caracteritzar el repertori de la cadena beta del receptor de cèl·lules T (TCR- β) en sang perifèrica i correlacionar-lo amb el curs clínic de la malaltia en una cohort de pacients amb càncer de pulmó no microcític (CPNM) avançat tractats amb bloquejants de l'eix PD-1/PD-L1 en primera línia. Per a això es van analitzar mostres de limfòcits obtinguts en dos moments: i) pretractament (PRE) i ii) al moment de la primera avaluació de resposta (1E). Es va seqüenciar la regió determinant de complementarietat 3 (CDR3) del TCR- β en les mostres per mitjà de seqüenciació de nova generació (NGS). La riquesa, equitat, convergència, índex de similitud de Jaccard i la freqüència dels segments variable (V), de diversitat (D) i d'unió (J), que són característiques del repertori de TCR- β perifèric, es van correlacionar amb les variables clínic-patològiques i pronòstiques de la cohort d'estudi. Els resultats van indicar que el grup de pacients fumadors tenien menor riquesa en el repertori TCR- β que els no fumadors ($p= 0,040$). Respecte a la dinàmica del TCR- β durant el tractament d'immunoteràpia, l'augment de la riquesa es va associar amb un benefici clínic durador (BCD; $p= 0,046$), supervivència lliure de progressió (SLP; $p= 0,007$) i supervivència global (SG; $p= 0,05$) més prolongades. A més, els pacients amb major índex de similitud de Jaccard entre les mostres PRE i 1E van mostrar una SLP més prolongada ($p= 0,021$). Segons els nostres resultats, una elevada freqüència de l'ús de fragments TRBV20-1 PRE es va associar amb BCD ($p= 0,027$). En línia amb aquests resultats, el grup de pacients amb nivells més alts de TRBV20-1 tant en la mostra PRE com 1E va mostrar una associació estadísticament significativa amb una SLP i SG més prolongades. En conclusió, durant el desenvolupament d'aquest treball de tesi doctoral, s'ha demostrat que l'anàlisi del repertori de TCR- β en mostres de sang perifèrica pot proporcionar informació important relacionada amb la resposta immune en pacients amb CPNM avançat tractats amb anti-PD-1, a més d'aportar informació prognòstica rellevant, posicionant-se com un possible biomarcador en aquest context clínic.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. CÁNCER	3
1.1. CONCEPTO DE CÁNCER	3
1.2. PROPIEDADES DE LAS CÉLULAS TUMORALES	3
2. MICROAMBIENTE TUMORAL.....	4
3. SISTEMA INMUNE Y CÁNCER.....	7
3.1. NEOANTÍGENOS Y ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T.....	8
3.2. CICLO CÁNCER-INMUNIDAD.....	10
3.3. INMUNOEDICIÓN DEL CÁNCER	12
3.4. PUNTOS DE CONTROL INMUNE.....	13
4. CÁNCER DE PULMÓN	18
4.1. EPIDEMIOLOGÍA	18
4.2. DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN.....	19
4.3. CLASIFICACIÓN	20
4.4. TRATAMIENTO	22
5. INMUNOTERAPIA	23
5.1. GENERALIDADES.....	23
5.2. BLOQUEANTES DE LOS PUNTOS DE CONTROL INMUNE.....	25
6. BIOMARCADORES.....	28
6.1. BIOMARCADORES EN CÁNCER	28
6.2. BIOMARCADORES EN INMUNOTERAPIA: SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS	29
7. NUEVOS BIOMARCADORES EN INMUNOTERAPIA: TCR	32
7.1. ESTRUCTURA DEL TCR	32
7.2. GENERACIÓN DEL REPERTORIO TCR.....	34
7.3. REPERTORIO TCR: ROL COMO BIOMARCADOR.	37
II. OBJETIVOS	41
III. MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. PACIENTES Y CONTROLES	47
1.1. PACIENTES Y VARIABLES CLÍNICAS.....	47
1.2. CONTROLES	48
2. MUESTRAS BIOLÓGICAS	48
2.1. SANGRE PERIFÉRICA.....	48
2.2. CÉLULAS MONONUCLEARES.....	49
2.3. RNA.....	50
2.3.1. EXTRACCIÓN DE RNA.....	50
2.3.2. CUANTIFICACIÓN DE RNA.....	50

2.3.3. EVALUACIÓN DE CALIDAD DE RNA	51
2.3.4. REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN	52
2.4. DNA	52
2.4.1. EXTRACCIÓN DE DNA	52
2.4.2. CUANTIFICACIÓN DE DNA	53
3. SECUENCIACIÓN DE TCR- β	53
3.1. AMPLIFICACIÓN DE REGIÓN CDR3 DE TCR- β	54
3.2. DIGESTIÓN PARCIAL DE LOS AMPLICONES	55
3.3. LIGACIÓN DE ADAPTADORES A AMPLICONES	56
3.4. PURIFICACIÓN Y ELUCIÓN DE LIBRERÍA.....	58
3.5. CUANTIFICACIÓN DE LIBRERÍAS DE TCR- β	58
3.6. COMBINACIÓN DE LIBRERÍAS	60
3.7. PREPARACIÓN DEL TEMPLADO.....	60
3.8. SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN	62
3.9. EVALUACIÓN DE CALIDAD DE SECUENCIACIÓN.....	64
3.10. PROCESAMIENTO DE LAS SECUENCIAS	65
4. CARACTERIZACIÓN DEL REPERTORIO DE TCR- β	66
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS	68
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES	73
2. ANÁLISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS DE LA SECUENCIACIÓN	75
2.1. SECUENCIACIÓN DE TCR- β A PARTIR DE DNA.....	75
2.1.1. CUANTIFICACIÓN DEL DNA.....	75
2.1.2. DATOS DE LA SECUENCIACIÓN DE TCR- β A PARTIR DE DNA	75
2.2. SECUENCIACIÓN DE TCR- β A PARTIR DE RNA	76
2.2.1. CUANTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE INTEGRIDAD DEL RNA	76
2.2.2. DATOS DE LA SECUENCIACIÓN DE TCR- β A PARTIR DE RNA	76
3. ANÁLISIS DEL REPERTORIO TCR: COMPARACIÓN ENTRE SECUENCIACIÓN DE RNA Y DNA	78
3.1. RIQUEZA, EQUIDAD Y CONVERGENCIA DEL REPERTORIO TCR- β A PARTIR DE RNA Y DE DNA.....	79
3.2. CLONOTIPOS DETECTADOS ENTRE SECUENCIACIÓN A PARTIR DE RNA Y DNA	80
4. DIFERENCIAS DEL REPERTORIO TCR- β EN SANGRE PERIFÉRICA ENTRE PACIENTES CON CPNM Y CONTROLES	83
5. CARACTERIZACIÓN DEL REPERTORIO DE TCR- β EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON CPNM AVANZADO TRATADOS CON BLOQUEANTES DE PD-1.....	87
5.1. ANÁLISIS DE RIQUEZA, EQUIDAD Y CONVERGENCIA DEL REPERTORIO TCR- β	87
5.1.1. CORRELACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS.....	90
5.1.2. CORRELACIÓN CON RESPUESTA Y VARIABLES PRONÓSTICAS	93

5.1.2.1. VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS	93
5.1.2.2. ANÁLISIS DE LOS ÍNDICES DE RIQUEZA, EQUIDAD Y CONVERGENCIA EN MUESTRAS BASALES.....	96
5.1.2.3. ANÁLISIS DE LOS ÍNDICES DE RIQUEZA, EQUIDAD Y CONVERGENCIA EN LA PRIMERA EVALUACIÓN DE RESPUESTA	99
5.1.2.4. DINÁMICAS DE LOS ÍNDICES DE RIQUEZA, EQUIDAD Y CONVERGENCIA.....	101
5.2. ANÁLISIS DE CLONOTIPOS A NIVEL NUCLEOTÍDICO Y RESPUESTA.....	109
5.3. ANÁLISIS DE LOS SEGMENTOS V y J DEL REPERTORIO TCR- β	111
5.3.1. FRECUENCIAS DE REORDENAMIENTOS V-J.....	112
5.3.1.1. REORDENAMIENTOS V-J EN MUESTRAS BASALES	112
5.3.1.2. REORDENAMIENTOS V-J EN LA PRIMERA EVALUACIÓN DE RESPUESTA	113
5.3.2. FRECUENCIAS DE SEGMENTOS V y J: VALOR PRONÓSTICO Y RELACIÓN CON RESPUESTA AL TRATAMIENTO	114
5.3.2.1. SEGMENTOS V y J EN MUESTRAS BASALES.....	116
5.3.2.2. SEGMENTOS V y J EN LA PRIMERA EVALUACIÓN DE RESPUESTA	120
5.3.2.3. DINÁMICA DE SEGMENTOS V y J	123
6. INTEGRACIÓN DE LOS RESULTADOS	127
IV. CONCLUSIONES	129
VI. REFERENCIAS	133
VII. MATERIALES SUPLEMENTARIOS	161
VIII. ANEXOS	169
1. APROBACIÓN COMITÉ DE ÉTICA DE LA INSTITUCIÓN	171
2. DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	173
3. FINANCIACIÓN.....	179
4. COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES	179
5. PUBLICACIÓN DERIVADA DE LA TESIS DOCTORAL.....	180

LISTADO DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

ADC: adenocarcinoma

ALC: recuento absoluto de linfocitos (del inglés, *absolute lymphocyte count*)

BCD: beneficio clínico duradero

bp: pares de bases

CAFs: fibroblastos asociados al cáncer (del inglés, *cancer associated fibroblasts*)

cDNA: DNA complementario (del inglés, *complementary DNA*)

CDR: regiones determinantes de complementariedad (del inglés, *complementarity determining regions*)

CDR3-β AA: secuencias de aminoácidos de la región CDR3 de TCR-β

CDR3-β NT: secuencias de nucleótidos de la región CDR3 de TCR-β

CPA: células presentadoras de antígenos

CPNM: cáncer de pulmón no microcítico

CS: controles sanos

CT: *cycle threshold*

CTL: linfocitos T citotóxicos (del inglés, *cytotoxic T lymphocyte*)

CTLA-4: antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (del inglés, *cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4*)

dMMR: deficientes en la reparación por mismatch (del inglés, *deficient mismatch repair*)

EE: enfermedad estable

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos (del inglés, *Food and Drug Administration*)

H⁺: iones de hidrógeno

HR: tasas de riesgo (del inglés, *hazard ratio*)

IASLC: Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (del inglés, *International Association for the Study of Lung Cancer*)

IC: puntos de control inmune (del inglés, *immune-checkpoint*)

ICBs: bloqueantes de *immune-checkpoint*

ICOS: coestimulador inducible de linfocitos T (del inglés, *inducible T-cell costimulator* del inglés, *inducible T-cell costimulator*)

IFN-γ: interferón gamma

IL: interleucina

IMGT: Sistema internacional de información ImMunoGeneTics (del inglés, *International ImMunoGeneTics information system*)

ISP: partículas esféricas (del inglés, *Ion Sphere™ Particles*)

ITIM: motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (del inglés, *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*)

ITK: inhibidores de tirosina quinasa

ITSM: motivo de cambio del inmunorreceptor basado en tirosina (del inglés, *immunoreceptor tyrosine-based switch motif*)

LAG-3: proteína 3 de activación de linfocitos (del inglés, *lymphocyte-activation gene 3*)

LCC: carcinoma de células grandes (del inglés, *large-cell carcinoma*)

MDSCs: células mieloides supresoras (del inglés, *myeloid-derived suppressor cell*)

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés, *major histocompatibility complex*)

ml: mililitros

MSI-H: alta inestabilidad de microsatélites (del inglés, *microsatellite instability-high*)

NGS: secuenciación de nueva generación (del inglés, *next generation sequencing*)

NK: células asesinas naturales (del inglés, *natural killer*)

NLR: ratio de neutrófilos/linfocitos (del inglés, *neutrophil to lymphocyte ratio*)

ORR: tasa de respuesta objetiva (del inglés, *objective response rate*)

P: pacientes

PBMCs: células mononucleares de sangre periférica (del inglés, *peripheral blood mononuclear cells*)

PBS: tampón fosfato salino (del inglés, *phosphate buffered saline*)

PCA: análisis de componentes principales (del inglés, *principal component analysis*)

PD-1: proteína 1 de muerte celular programada (del inglés, *programmed cell death protein 1*)

PD-L1: ligando 1 de muerte celular programada (del inglés, *programmed death-ligand 1*)

PD-L2: ligando 2 de muerte celular programada (del inglés, *programmed death-ligand 2*)

PE: progresión de enfermedad

PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa (del inglés, *phosphoinositide-3-kinase*)

PRE: pretratamiento

qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real

RC: respuesta completa

RECIST: del inglés, *Response Evaluation Criteria in Solid Tumours*

RIN: número de integridad del RNA (del inglés, *RNA Integrity number*)

RP: respuesta parcial

RSS: secuencias señal de recombinación (del inglés, *recombination signal sequences*)

RT: reacción de retrotranscripción

SCC: carcinoma de células escamosas o epidermoides (del inglés, *squamous cell carcinoma*)

SG: supervivencia global

SLP: supervivencia libre de progresión

SPSS: del inglés, *Statistical Package for the Social Sciences*

TCR: receptores de células T (del inglés, *T cell receptor*)

TdT: enzima desoxinucleotidil transferasa terminal

TGF-β: factor de crecimiento transformante beta (del inglés, *transforming growth factor*)

beta)

Th: linfocitos T colaboradores (del inglés, *T helpers*)

TIGIT: inmunoglobulina de células T y dominio ITIM (del inglés, *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*)

TILs: linfocitos infiltrantes de tumores (del inglés, *tumor-infiltrating lymphocytes*)

TIM3: proteína 3-portadora de dominio de mucina (del inglés, *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*)

TMB: carga mutacional tumoral (del inglés, *tumor mutation burden*)

TME: microambiente tumoral (del inglés, *tumor microenvironment*)

TNFR: receptor del factor de necrosis tumoral (del inglés, *tumour necrosis factor receptor*)

TNM: sistema de estadificación tumor-nódulos-metástasis

TPS: puntuación de proporción tumoral (del inglés, *tumor proportion score*)

Tregs: células T reguladoras (del inglés, *T-regulatory lymphocyte*)

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés, *vascular endothelial growth factor*)

VISTA: supresor Ig del dominio V de la activación de células T (del inglés, *V-domain Ig suppressor of T cell activation*)

μl: micro litros

1E: primera evaluación de respuesta

95%CI: intervalo de confianza del 95%

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Propiedades del cáncer.	4
Figura 2. Componentes celulares del TME.	5
Figura 3. Presentación antigénica y activación de células T.....	10
Figura 4. Representación del ciclo cáncer-inmunidad.	11
Figura 5. Fases del proceso de inmunoedición en cáncer.....	12
Figura 6. Representación de ICs inhibidores y estimulantes entre célula T, célula tumoral, macrófago y célula dendrítica.	14
Figura 7. Mecanismo de acción de CTLA-4.	16
Figura 8. Mecanismo de acción de PD-1/PD-L1.....	17
Figura 9. Incidencia y mortalidad estimadas de los tumores más frecuentes en el año 2020 a nivel mundial.	19
Figura 10. Subtipos histológicos más frecuentes del cáncer de pulmón de células no pequeñas.....	21
Figura 11. Alteraciones moleculares en los subtipos histológicos de CPNM.....	22
Figura 12. Mecanismo de acción de los ICBs anti-CTLA-4 y anti-PD-1/PD-L1.....	26
Figura 13. Esquema de tratamiento para el CPNM en estadios avanzados sin mutaciones <i>driver</i>	27
Figura 14. Estructura de TCR.	33
Figura 15. Complejo receptor TCR/CD3.....	34
Figura 16. Recombinación V(D)J.	35
Figura 17. Regiones de mayor variabilidad del TCR- β : CDR1, CDR2 y CDR3.....	37
Figura 18. Linfocitos T y reconocimiento de neoantígenos tumorales.	37
Figura 19. Obtención de las PBMCs mediante gradiente de densidad en <i>Ficoll</i>	49
Figura 20. Electroferograma de muestras de RNA con diferentes RIN.	51
Figura 21. Amplificación de la región CDR3 del TCR- β	53
Figura 22. Amplificación de TCR- β CDR3 y digestión parcial de los amplicones.....	56
Figura 23. Ligación de adaptadores a amplicones.....	57
Figura 24. Pasos de reacción de qPCR con sondas <i>TaqMan</i> [®]	59
Figura 25. Ejemplo de gráfico de amplificación de PCR.....	60

Figura 26. El instrumento <i>Ion Chef^{ETM}</i> utilizado para la preparación del templado previo a la secuenciación.	61
Figura 27. Esquema de PCR de emulsión.	62
Figura 28. Secuenciación por síntesis.	63
Figura 29. Distribución de lecturas obtenidas por librerías de CDR3 TCR- β a partir de DNA. .	75
Figura 30. Ejemplos de perfiles electroforéticos en el bioanalizador <i>Agilent 2100</i> de las muestras de RNA.	76
Figura 31. Distribución de lecturas obtenidas por librerías de CDR3 TCR- β a partir de RNA. .	77
Figura 32. Análisis comparativo de los índices de riqueza, equidad y convergencia del repertorio de TCR- β de acuerdo de las metodologías de secuenciación basada en DNA y RNA.	80
Figura 33. Distribución de los clonotipos CDR3 NT según porcentaje de representación.	80
Figura 34. Ejemplo representativo de la comparación de los clonotipos para muestra P10-PRE.	82
Figura 35. Comparación del índice de riqueza entre pacientes con CPNM en estadios avanzados y controles.	84
Figura 36. Análisis de componentes principales (PCA) en pacientes con CPNM en estadios avanzados y controles.	85
Figura 37. Comparación de frecuencias de segmentos V entre pacientes con CPNM en estadios avanzados y controles.	86
Figura 38. Análisis de los índices de riqueza, equidad y convergencia obtenidos de la secuenciación del repertorio de TCR- β entre muestras basales y la primera evaluación de respuesta.	89
Figura 39. Relación de la riqueza de TCR- β en sangre periférica basal con el hábito de fumar.	92
Figura 40. Correlación entre los índices de riqueza, equidad y convergencia del repertorio TCR- β en las muestras basales y el beneficio clínico.	96
Figura 41. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de acuerdo a los índices de riqueza y equidad del repertorio TCR- β en muestras basales.	98
Figura 42. Correlación entre los índices de riqueza, equidad y convergencia del repertorio TCR- β en las muestras de la primera evaluación y el beneficio clínico.	99
Figura 43. Curvas de supervivencia libre de progresión Kaplan-Meier de acuerdo al índice de riqueza del TCR- β de la primera evaluación de respuesta.	100
Figura 44. Dinámica de cambios producidos en los índices de riqueza, equidad y convergencia del repertorio TCR- β entre las muestras basales y de la primera evaluación de respuesta. .	102

Figura 45. Correlación de las dinámicas de los índices de riqueza, equidad y convergencia del repertorio TCR- β entre las muestras basales y de la primera evaluación de respuesta con el beneficio clínico.....	103
Figura 46. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier de acuerdo a los cambios de riqueza entre las muestras basales y de la primera evaluación de respuesta.	104
Figura 47. Correlaciones entre cambios en el recuento absoluto de linfocitos y cambios en la riqueza de TCR entre las muestras basales y de la primera evaluación de respuesta.	105
Figura 48. Correlación del índice de Jaccard entre las muestras basales y de la primera evaluación de respuesta con el beneficio clínico.	109
Figura 49. Índice de Jaccard entre las muestras basales y de la primera evaluación de respuesta según el beneficio clínico.....	110
Figura 50. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier de acuerdo al índice de Jaccard entre las muestras basales y la primera evaluación de respuesta.	111
Figura 51. Diagrama de Sankey de los 20 reordenamientos V-J más abundantes en muestras basales.....	112
Figura 52. Diagrama de Sankey de los 20 reordenamientos V-J más abundantes en muestras de la primera evaluación de respuesta.....	113
Figura 53. Segmentos V y J en muestras basales y la primera evaluación de respuesta.	115
Figura 54. Frecuencias de segmentos V y J en muestras basales.	116
Figura 55. Correlación de frecuencias de segmentos V y J en muestras basales con el beneficio clínico.....	117
Figura 56. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier de acuerdo a las frecuencias de segmentos V en muestras basales.....	119
Figura 57. Frecuencias de segmentos V y J en muestras de primera evaluación de respuesta.	121
Figura 58. Correlación de frecuencias de segmentos V y J en muestras de la primera evaluación con el beneficio clínico.	121
Figura 59. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier de acuerdo a las frecuencias de TRBV20-1 en muestras de la primera evaluación de respuesta.....	123
Figura 60. Cambios de frecuencias de los segmentos V y J entre las muestras basales y de la primera evaluación de respuesta.	124
Figura 61. Dinámicas de frecuencias de segmentos V y J entre las muestras basales y de la primera evaluación de respuesta según el beneficio clínico.	125
Figura 62. Características del repertorio de TCR- β en sangre periférica en una respuesta favorable al anti-PD-1.....	128

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes para la RT.....	52
Tabla 2. Condiciones de tiempo y temperatura para la RT.	52
Tabla 3. Componentes de la reacción de PCR de amplificación de cDNA.....	54
Tabla 4. Programa de ciclado para la amplificación de cDNA.....	54
Tabla 5. Componentes de la reacción de PCR de amplificación de DNA.	55
Tabla 6. Programa de ciclado para la amplificación de DNA.....	55
Tabla 7. Programa de ciclado para la digestión de amplicones.	56
Tabla 8. Componentes de la ligación de adaptadores a amplicones.	57
Tabla 9. Programa de ciclado para la ligación de adaptadores a amplicones.....	57
Tabla 10. Condiciones de la qPCR.....	60
Tabla 11. Métricas para evaluar la calidad de la secuenciación.	65
Tabla 12. Clasificación de lecturas.	66
Tabla 13. Características demográficas y clínico-patológicas de los pacientes del estudio.	74
Tabla 14. Índices de riqueza, equidad y convergencia del repertorio TCR- β obtenidos a partir de secuenciación de RNA y DNA.	79
Tabla 15. Índices de riqueza, equidad y convergencia del repertorio de TCR- β en pacientes con CPNM y controles sanos.	83
Tabla 16. Valores de los índices del repertorio de TCR- β para cada paciente.	88
Tabla 17. Correlaciones entre los índices de riqueza, equidad y convergencia del repertorio de TCR- β basal y variables demográficas/clínico-patológicas.....	91
Tabla 18. Relación entre los índices de riqueza, equidad y convergencia del repertorio de TCR- β basal y factores de inflamación sistémica.	92
Tabla 19. Correlación entre variables demográficas/clínico-patológicas y beneficio clínico. ...	94
Tabla 20. Resultados del análisis de Cox univariante para variables demográficas/clínico-patológicas.	95
Tabla 21. Análisis de Cox univariante basado en los índices de riqueza, equidad y convergencia en las muestras basales.....	97

Tabla 22. Análisis de Cox univariante basado en los índices de riqueza, equidad y convergencia en las muestras a la primera evaluación de respuesta.....	100
Tabla 23. Análisis de Cox univariante basado en las dinámicas de los índices de riqueza, equidad y convergencia entre las muestras basales y de la primera evaluación de respuesta.	103
Tabla 24. Clonotipos convergentes del paciente P8.	106
Tabla 25. Clonotipos convergentes de los pacientes P2, P9 y P15.....	107
Tabla 26. Análisis de Cox univariante basado en el índice de Jaccard entre las muestras basales y de la primera evaluación de respuesta.	110
Tabla 27. Análisis de Cox univariante basado en las frecuencias de segmentos V y J en muestras basales.	118
Tabla 28. Análisis de Cox univariante basado en las frecuencias de segmentos V en muestras de la primera evaluación de respuesta.....	122
Tabla 29. Análisis de Cox univariante basado en la frecuencia de TRBV20-1 en primera evaluación de respuesta.	122
Tabla 30. Análisis de Cox univariante basado en las dinámicas de frecuencias de segmentos V y J entre las muestras basales y de la primera evaluación de respuesta.	125
Tabla S1. Sistema de estadificación TNM de cáncer de pulmón.....	163
Tabla S2. Octava edición del sistema TNM en cáncer de pulmón.	164
Tabla S3. Características demográficas de cada uno de los pacientes.....	165
Tabla S4. Características clínico-patológicas de cada uno de los pacientes.....	166

I. INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER

1.1. CONCEPTO DE CÁNCER

Cáncer es un término genérico que se refiere a un conjunto heterogéneo de patologías relacionadas que se pueden originar y afectar a cualquier parte del cuerpo, y difieren en su histogénesis, morfogénesis, evolución clínica y pronóstico. Actualmente, existen más de 200 tipos de cáncer con distintas características histopatológicas y moleculares (Siegel et al., 2021).

Una característica definitoria del cáncer es el crecimiento y proliferación descontrolado y desordenado de las células neoplásicas con el potencial de extenderse e invadir otros tejidos o propagarse a otras partes del cuerpo, en el proceso conocido como metástasis (Hahn & Weinberg, 2002). Sin embargo, el concepto actual de cáncer es más heterotípico y comprende no sólo a las células tumorales sino también a las que forman parte del microambiente tumoral (TME; del inglés, *tumor microenvironment*), que se transforman en beneficio del desarrollo de las células neoplásicas, contribuyendo a la enorme complejidad de la biología tumoral.

1.2. PROPIEDADES DE LAS CÉLULAS TUMORALES

En el año 2000, Hanahan y Weinberg proponen un modelo de seis propiedades distintivas o *Hallmarks* que caracterizan a las células tumorales. Las propiedades incluyeron: señalización proliferativa mantenida, evasión de las señales supresoras del crecimiento, invasión tisular y metástasis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis y evasión de la apoptosis (Hanahan & Weinberg, 2000).

Más tarde para mejorar y ampliar el concepto de características del cáncer, estos mismos autores (Hanahan & Weinberg, 2011) incorporan cuatro propiedades más a las ya descritas anteriormente: inestabilidad genómica, reprogramación del metabolismo energético, inflamación mantenida, evasión del control del sistema inmunológico (Figura 1).

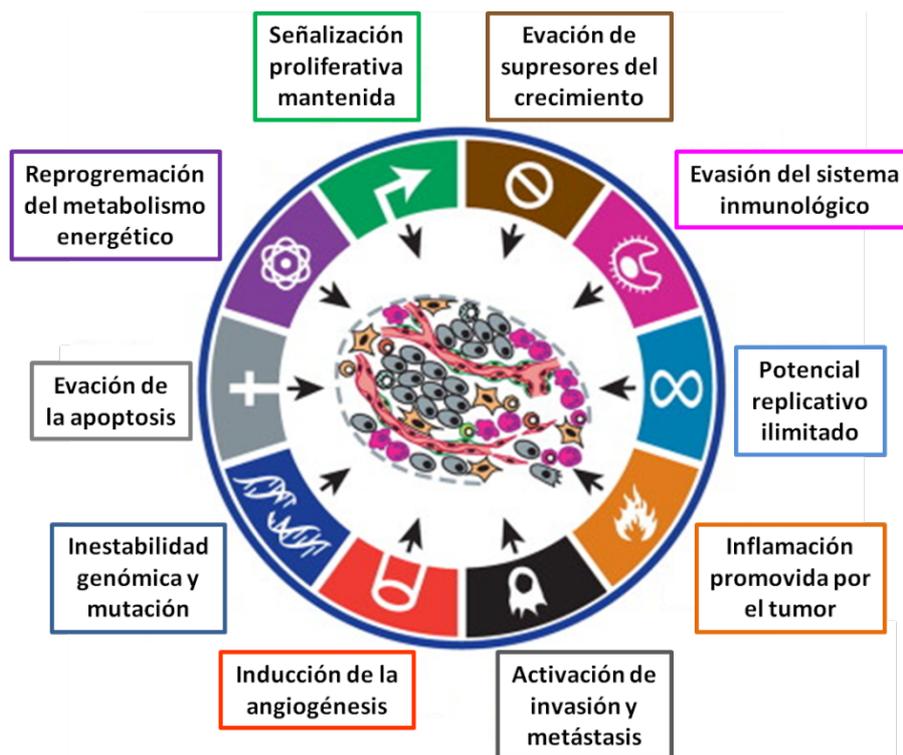


Figura 1. Propiedades del cáncer. Adaptado y traducido de Hanahan & Weinberg, 2011.

2. MICROAMBIENTE TUMORAL

El microambiente de los tejidos normales puede inhibir efectivamente el crecimiento tumoral y es una barrera importante para defenderse de los tumores. Sin embargo, las células tumorales pueden reducir el efecto antitumoral normal mediante el reclutamiento de fibroblastos, la regulación de las células inmunitarias antitumorales, la secreción de moléculas inmunosupresoras, etc., y así, se transforma en un microambiente adecuado para el crecimiento tumoral (Lyssiotis & Kimmelman, 2017). El TME comprende varios tipos de células tales como: células endoteliales, fibroblastos, células de la inmunidad innata y adaptativa, células del estroma, mediadores solubles y componentes extracelulares (citocinas, factores de crecimiento, hormonas, matriz extracelular, etc.) que participan en la comunicación intercelular y modulan su funcionamiento (Hinshaw & Shevde, 2019; Wu & Dai, 2017). Todas las células y componentes de TME interactúan mutuamente y participan en el proceso de carcinogénesis, progresión tumoral y metastatización (Figura 2) (Jantus-Lewintre

& Usó, 2015).

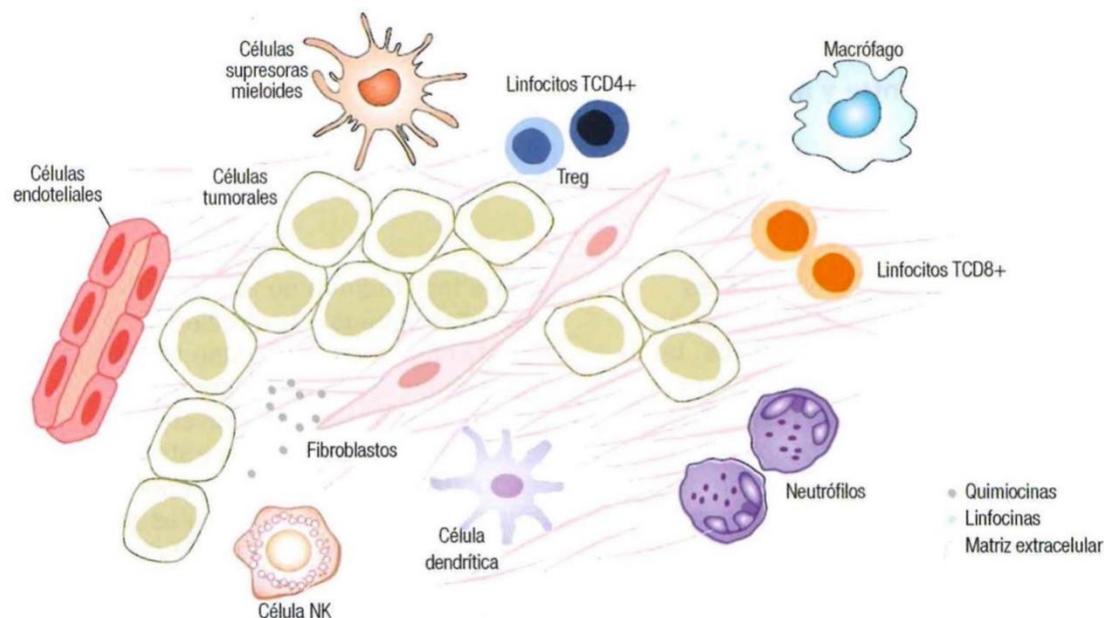


Figura 2. Componentes celulares del TME. Adaptado de Jantus-Lewintre & Usó, 2015.

Las células tumorales están en estrecho contacto con el estroma tumoral compuesto por fibroblastos asociados al cáncer, células de la vasculatura, células inflamatorias productoras de citocinas y quimiocinas, y componentes de la matriz extracelular. Treg: células T reguladoras; NK: células asesinas naturales.

La matriz extracelular, uno de los componentes principales del TME, es una red compleja de macromoléculas, compuesta por colágeno, proteoglicanos, elastina, fibronectina, lamininas y otras glicoproteínas. Durante el desarrollo del cáncer, la desorganización de la matriz extracelular afecta el comportamiento de las células tumorales y del estroma, promoviendo la inflamación, neovascularización e invasión de tejidos (Theocharis et al., 2016). Existe mucha evidencia de que el TME es más rígido que el estroma normal. Esto se debe al desequilibrio entre la síntesis y la secreción de los componentes de la matriz extracelular y a la acción de enzimas como las metaloproteasas, que interfieren en la degradación y reconstrucción de esta matriz (Jantus-Lewintre & Usó, 2015).

Una gran proporción de las células que forman parte del TME corresponde a los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs; del inglés, *cancer associated fibroblasts*). Los CAFs están compuestos por varias poblaciones originadas a partir de diferentes células, tales como: fibroblastos, pericitos o incluso células mesenquimales reclutadas de la médula ósea (Bremnes et al., 2011). Se ha demostrado que los CAFs participan en el remodelado de la

INTRODUCCIÓN

matriz extracelular y proporcionan señales críticas que favorecen la progresión del tumor (Sahai et al., 2020).

Sin dudas, un elemento “clave” en el desarrollo de los tumores es el sistema inmunológico, incluyendo tanto a las células de la inmunidad innata como de la adaptativa que están implicadas en promover la eliminación de las células tumorales. Aunque la función principal de la respuesta inmune es el reconocimiento de células anormales y su posterior eliminación, la naturaleza inmunosupresora del TME y otros mecanismos de evasión utilizados por las células tumorales para evitar ser reconocidas por el sistema inmunológico, son una característica distintiva de los tumores que ha sido incluida como uno de las propiedades o *Hallmarks* del cáncer propuestos por Hanahan y Weinberg (Hanahan & Weinberg, 2011). Además, en el TME, existe altas concentraciones de sustancias reactivas del oxígeno y del nitrógeno, citocinas inhibitorias como las interleucinas (IL) IL-4, IL-10 e IL-13 o el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β ; del inglés, *transforming growth factor beta*), que inducen anergia en las células inmunes, a las que se suma la presencia de poblaciones seleccionadas de células reguladoras o supresoras de la respuesta inmune, tanto del origen linfoide como del mieloide. Los linfocitos T reguladores (Tregs; del inglés, *T-regulatory lymphocyte*) son las células de linaje linfoide más conocidas con función inmunosupresora (Munn & Bronte, 2016). En cuanto a las de linaje mieloide, hay algo más de variedad. Por ejemplo, los macrófagos de tipo M2 producen preferentemente IL-10 y TGF- β , dos citocinas con funciones inhibitorias (Mantovani et al., 2006). Las células supresoras de origen mieloide (MDSCs; del inglés, *myeloid-derived suppressor cells*) son el otro grupo de células supresoras, compuesta por un conjunto de células inmaduras que no han terminado de diferenciarse hasta células dendríticas, macrófagos o granulocitos (Serafini et al., 2004).

Como se ha mencionado previamente, el TME contribuye en muchos aspectos de la carcinogénesis, y puede afectar la forma en que el comportamiento de las células tumorales, por lo que la modulación de las interacciones entre las células del estroma y las células tumorales cobra cada vez más relevancia en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en cáncer.

3. SISTEMA INMUNE Y CÁNCER

El sistema inmune es un sistema de defensa del huésped que comprende un conjunto de estructuras y procesos biológicos dentro del organismo, y protege contra agresiones, ya sean agentes patógenos, contaminantes, radiaciones o células cancerosas. Según la forma de adquisición, el proceso de reconocimiento y el mecanismo del efecto, el sistema inmunitario se puede dividir en dos grandes categorías: inmunidad innata e inmunidad adaptativa (Parkin & Cohen, 2001).

La inmunidad innata es la primera línea de defensa del cuerpo contra la invasión de patógenos. Células, tales como macrófagos, células dendríticas, granulocitos, células NK (del inglés, *natural killer*), etc., están involucradas en la inmunidad innata. Algunos de estos tipos de células poseen un grupo de receptores para el reconocimiento de patrones moleculares con poca especificidad, respondiendo de forma rápida e inespecífica mediante la secreción de citocinas y quimioquinas para reclutar más células inmunes. Asimismo, tienen lugar la actividad fagocítica de los macrófagos y neutrófilos, y la acción citolítica mediada por las células NK. En este sentido, forma la primera barrera y permite el inicio de la respuesta inmune. Además, los macrófagos y las células NK, conocidos como células presentadoras de antígenos (CPA), constituyen el eslabón entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, ya que participan en la presentación de antígeno, promoviendo la activación y expansión de células específicas con función antitumoral (Demaria et al., 2019; Gajewski et al., 2013).

La inmunidad adaptativa está compuesta por células B y T principalmente. Las células B son células involucradas en la inmunidad humoral. Se transforman en células plasmáticas bajo la estimulación de antígenos, y se sintetizan inmunoglobulinas (anticuerpos). Las inmunoglobulinas son unas proteínas que circulan por la sangre. Cuando reconocen sustancias extrañas para el organismo, como los virus, las bacterias o sus toxinas, las neutralizan. Mientras tanto, las células T son elementos imprescindibles para la inmunidad celular. Después de ser estimulados por el antígeno, las células T se transforman en linfocitos sensibilizados y coordinan la respuesta inmune a través de la producción de factores solubles, como las citocinas y quimioquinas, mostrando una respuesta inmune

INTRODUCCIÓN

específica (Cronkite & Strutt, 2018).

La población de linfocitos T abarca a su vez varios subgrupos de células con diferentes funciones. Los dos subtipos principales de los linfocitos T son los CD8+ o linfocitos T citotóxicos (CTL; del inglés, *cytolytic T lymphocyte*), especializados en matar diferentes patógenos, células infectadas o células tumorales; y los CD4+, compuestos por linfocitos T colaboradores (Th; del inglés, *T helpers*) y Tregs, especializados en coordinar la respuesta tisular y del sistema inmune en establecer y maximizar las capacidades de defensa (Glatzová & Cebecauer, 2019; Ostroumov et al., 2018).

En los seres humanos, las células T se desarrollan a partir de progenitores de los tejidos hematopoyéticos durante su desarrollo tímico y se adquiere la capacidad de reconocer antígenos para proteger contra patógenos diferentes. Basado en la complementariedad estructural del receptor específico de antígeno con el epítipo derivado del patógeno, una selección de células T se realiza en la etapa inicial de la respuesta inmune adaptativa (Cooper & Alder, 2006). Las células reclutadas realizan sus funciones efectoras y después de que el patógeno se elimina, algunas de estas células generan una memoria inmunitaria, proporcionando una protección inmunitaria más rápida y efectiva contra los antígenos recurrentes particulares (Gajewski et al., 2013). El nivel de control que el sistema inmune es capaz de ejercer contra el cáncer es crucial y, basados en la efectividad de este control, diferentes condiciones se podrían establecer que afectan tanto el crecimiento como la capacidad de diseminación tumoral y, por lo tanto, influir en el pronóstico en cáncer (Janssen et al., 2017; Mlecnik et al., 2011).

La presentación antigénica y la activación de células T se explican a continuación.

3.1. NEOANTÍGENOS Y ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T

Neoantígenos tumorales, también conocidos como antígenos específicos de tumor, son proteínas reconocidas como no propias por nuestro sistema inmunológico que están presentes en las células neoplásicas y que están completamente ausentes en los tejidos

normales (Yi et al., 2018). Para los tumores sin una etiología viral, los neoantígenos tumorales pueden derivar de una variedad de alteraciones genéticas no sinónimas que incluyen variaciones de nucleótido único, inserciones, deleciones, fusiones de genes, mutaciones por desplazamiento del marco de lectura, y variaciones estructurales (Jiang et al., 2019; Schumacher & Schreiber, 2015). Para los tumores asociados con virus oncogénicos, como el cáncer de cuello uterino relacionado con el virus del papiloma humano, el carcinoma de células de Merkel relacionado con el poliomavirus de células de Merkel, etc., cualquier epítipo derivado de proteínas víricas es una fuente potencial de neoantígenos (Feng et al., 2008; Walboomers et al., 1999). En los últimos años, se ha sugerido que los neoantígenos desempeñan un papel fundamental en la inmunidad antitumoral mediada por células T específicas (Yarchoan et al., 2017a; Schumacher et al., 2019).

Cuando se procesan dentro de la célula tumoral y se presentan por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC; del inglés, *major histocompatibility complex*) de clase I en la superficie de las células tumorales, los neoantígenos pueden ser reconocidos por los receptores de células T (TCR; del inglés, *T cell receptor*). De esta forma, aquellos linfocitos T *naïve* que posean un TCR específico para un antígeno específico tumoral, se unirán al péptido formando un complejo MHC-péptido-TCR (Riley et al., 2018). Pero para que las células T se activen, se requiere una segunda señal mediada por moléculas co-estimuladoras. Esta acción se consigue mediante la unión entre el receptor co-estimulador CD28 expresado en la superficie de las células T *naïve* y a su ligando B7.1 o B7.2 (CD80 o CD86, respectivamente) expresado por las CPAs (Figura 3) (Coulie et al., 2014; Nagai & Azuma, 2019). Por último hace falta aún una tercera señal, que se genera por la secreción de citocinas, la cual, junto con las señales anteriores, posibilita la activación completa y la proliferación de las células T activadas (Tavera et al., 2018).

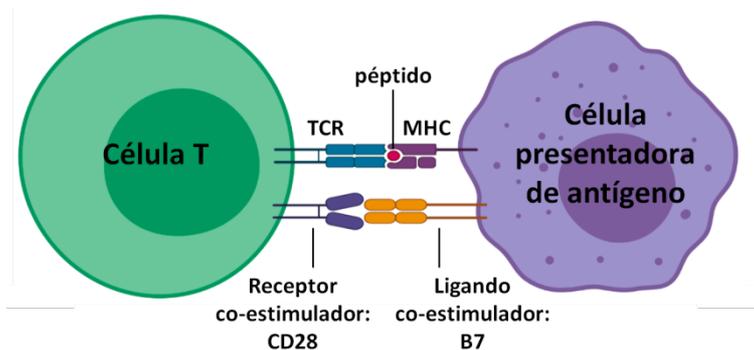


Figura 3. Presentación antigénica y activación de células T.

Para la activación de las células T, debe haber unión del TCR tanto al péptido antigénico como a la molécula del MHC en una célula presentadora de antígeno; además, una de la segunda señal mediada por CD28 es necesaria para la activación de los linfocitos T. TCR: receptor de células T; MHC: moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad; CD28: correceptor estimulador; B7: ligando de CD28.

Este proceso, si ocurre de forma correcta conllevaría a la eliminación de las células tumorales por el sistema inmune, lo que se conoce como ciclo cáncer-inmunidad.

3.2. CICLO CÁNCER-INMUNIDAD

El ciclo cáncer-inmunidad se define como una serie de eventos que ocurren durante la respuesta inmune antitumoral y conducen a la destrucción eficaz de las células tumorales. Este ciclo consta de siete pasos, donde los linfocitos T citotóxicos juegan un papel importante (Figura 4) (Chen & Mellman, 2013):

Paso ①: En este paso, los neoantígenos son procesados y presentados en el marco de moléculas de MHC.

Paso ②: A continuación, los neoantígenos unidos a las moléculas MHC se presentan a las células T. Los receptores de células T CD8+ pueden reconocer las moléculas de péptido-MHC clase I; mientras tanto los receptores de células T CD4+ reconocen las moléculas de péptido-MHC clase II.

Paso ③: Las células T efectoras se activan para responder a los neoantígenos presentados. Para que se produzca una respuesta de células T contra estos antígenos, es necesaria la presencia de señales co-estimuladoras, citocinas proinflamatorias y otros factores liberados

por células tumorales necróticas o incluso por la microbiota intestinal (Ferguson et al., 2011).

Paso ④: Las células T activadas se trasladan al sitio del tumor.

Paso ⑤: Las células T se infiltran dentro del tumor.

Paso ⑥: Los linfocitos T reconocen los neoantígenos presentados en las células tumorales (siempre asociados a moléculas de MHC-I) a través de la interacción con los TCRs.

Paso ⑦: Las células T atacan y destruyen las células tumorales liberando perforinas y granzima. La célula tumoral muerta libera neoantígenos específicos (paso ①) para continuar el ciclo y, amplificar y profundizar la respuesta antitumoral.

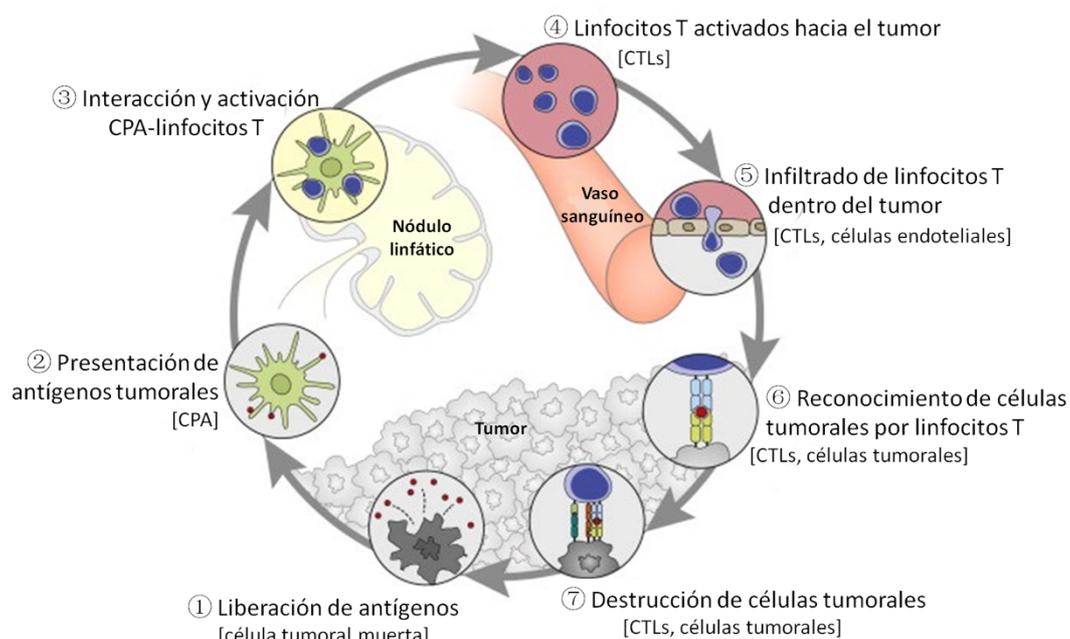


Figura 4. Representación del ciclo cáncer-inmunidad. Adaptado y traducido de Chen & Mellman, 2013.

El ciclo consta de siete pasos representados por números en la figura (del ① al ⑦). Los tipos de células involucrados en cada paso se muestran entre corchetes. CPA: células presentadoras de antígenos; CTLs: linfocitos T citotóxicos.

Sin embargo, en pacientes con cáncer, este ciclo no es completamente efectivo, debido a que existen mecanismos en cada uno de los pasos que conducen a que el tumor sea capaz de evadir la acción del sistema inmune (Motz & Coukos, 2013).

3.3. INMUNOEDICIÓN DEL CÁNCER

Incluso en las primeras etapas de la tumorigénesis, las células cancerosas pueden expresar distintos marcadores específicos del tumor y generar señales proinflamatorias de "peligro" que inician el proceso de inmunoedición del cáncer. La inmunoedición del cáncer es el proceso mediante el cual el sistema inmune puede restringir y promover el desarrollo del tumor. El proceso de inmunoedición está conformado por tres fases (Figura 5) (Dunn et al., 2004):

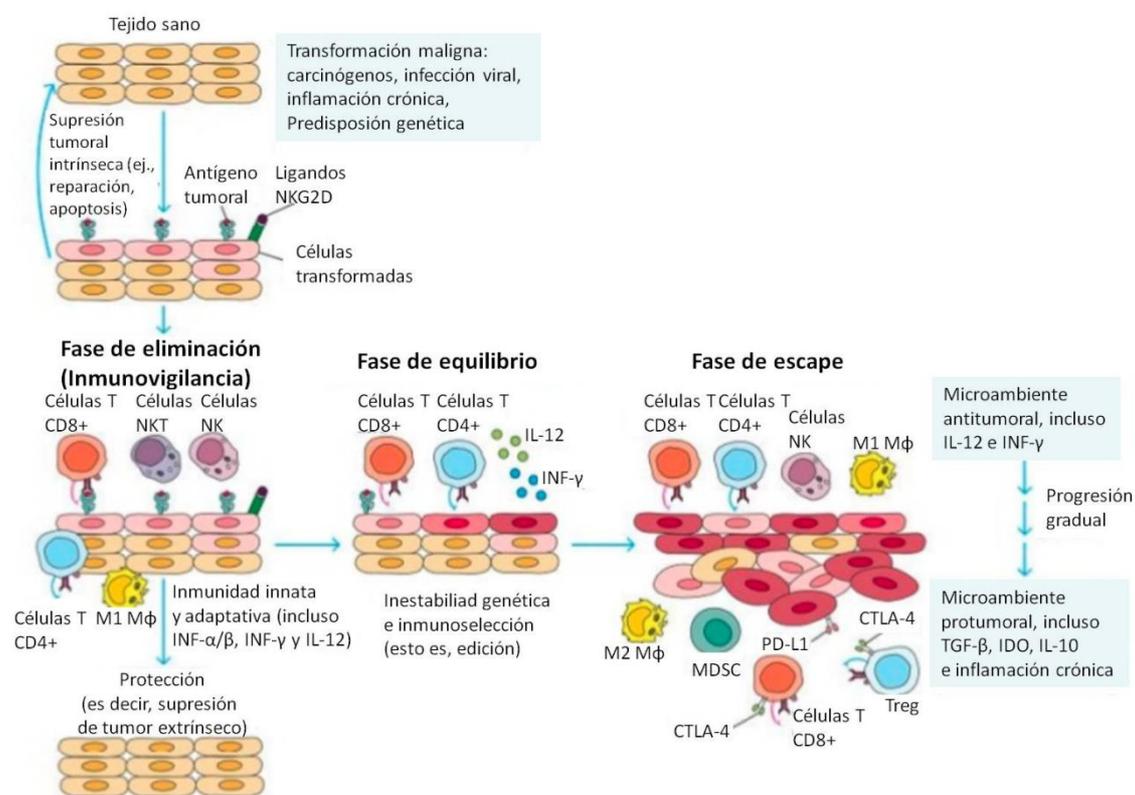


Figura 5. Fases del proceso de inmunoedición en cáncer. Adaptado y traducido de Dunn et al., 2004. CTLA-4: antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos; IDO: indolamina 2,3-dioxigenasa; INF: interferón; IL: interleucinas; M1 MΦ: macrófagos de tipo M1; M2 MΦ: macrófagos de tipo M2; MDSC: células supresoras derivadas de mieloides; NK: células asesinas naturales; NKG2D: células asesinas naturales grupo 2 de tipo D; NKT: células T asesinas naturales; PD-L1: ligando 1 de muerte celular programada; TGF: factor de crecimiento transformante beta; Treg: células T reguladoras.

Eliminación: En esta fase, las células y moléculas de inmunidad innata y adaptativa, que componen la red de inmunovigilancia del cáncer, pueden reconocer y destruir a las células tumorales, protegiendo al huésped de la formación de tumores (Kim et al., 2007).

Equilibrio: En algunos casos, debido a la inestabilidad genética de las células tumorales, algunas de ellas van adquiriendo ventajas selectivas que les permiten evadir la inmunovigilancia, sobreviviendo a la fase de eliminación y pasando a la fase de equilibrio. Se requieren células T, IL-12 e interferón gamma (IFN- γ) para mantener las células tumorales en esta fase, mientras que las células NK y las moléculas que participan en el reconocimiento o la función efectora de las células de inmunidad innata no serían necesarias. Esto sugiere que el equilibrio es una función únicamente de la inmunidad adaptativa (Schreiber et al., 2011).

Escape: Es la fase por la cual las células tumorales han adquirido capacidad suficiente para romper el equilibrio de la fase anterior, evadiendo a la respuesta inmune sin obstáculos. En esta fase, aparte del fallo del ciclo cáncer-inmunidad, también están implicados los factores inducidos por las células inmunes o tumorales del TME, por ejemplo, IL-10, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF; del inglés, *vascular endothelial growth factor*) y TGF- β (Locquenghien et al., 2021). Por otra parte, las células inmunosupresoras, como Tregs y macrófagos asociados a tumores de tipo M2, son reclutados por las células tumorales en esta fase, y actúan para inhibir la respuesta antitumoral del huésped (Dunn et al., 2004).

3.4. PUNTOS DE CONTROL INMUNE

Como se ha explicado, la activación de las células T de CPA requiere varias señales. Estas señales están reguladas minuciosamente por el equilibrio entre moléculas activadores e inhibidores, llamadas puntos de control inmune (IC; del inglés, *immune checkpoint*). La mayoría de los ICs están expresados en las células del sistema inmunitario adaptativo, especialmente en las células T, y en las células del sistema inmunitario innato, pero cada vez hay más evidencias que los ICs se expresan en una fracción considerable de tipos de tumores (Zhang & Zheng, 2020). Los ICs consisten en señales tanto estimuladoras como inhibitorias que son importantes para modular el tipo, la magnitud y la duración de las respuesta inmunes (Figura 6) (Pardoll, 2012).

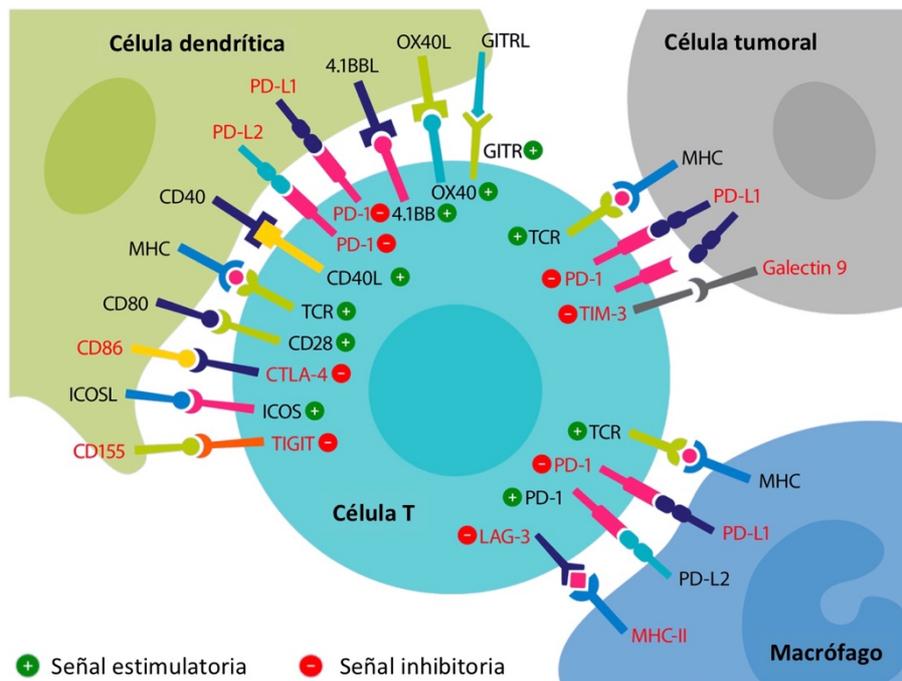


Figura 6. Representación de ICs inhibitorios y estimulantes entre célula T, célula tumoral, macrófago y célula dendrítica. Adaptado y traducido de Pardoll, 2012.

COSL: ligando de molécula coestimuladora inducible; CTLA-4: antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos; GITR: receptor de TNF inducible por glucocorticoides; ICOS: coestimulador inducible de linfocitos T; LAG-3: proteína 3 de activación de linfocitos; MHC: moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad; OX40: CD134; PD-1: proteína 1 de muerte celular programada; PD-L1: ligando 1 de muerte celular programada; PD-L2: ligando 1 de muerte celular programada; TCR: receptor de células T; TIGIT: inmunoglobulina de células T y dominio ITIM; TIM3: proteína 3-portadora de dominio de mucina; 4.1BB: CD137.

Los ICs estimulatorios pueden promover la activación y proliferación de los linfocitos. Uno de los receptores más importantes es el CD28. Al unir el CD28 con B7, se inicia una señalización corriente abajo a través de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K; del inglés, phosphoinositide-3-kinase) a Akt (Nagai & Azuma, 2019). La activación de Akt conduce a la fosforilación de varias proteínas asociadas con el metabolismo y proliferación celular, y la producción de citocinas. CD28 promueve la expresión de otros ICs estimulatorios clave en las familias CD28 y del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR; del inglés, *tumour necrosis factor receptor*), como el coestimulador inducible de linfocitos T (ICOS; del inglés, *inducible T-cell costimulator*), OX40 (CD134) y 4.1BB (CD137), que ayudan en mantener la respuesta inmune (Huang et al., 2019).

La activación de las células T impulsa la expresión de los ICs inhibitorios que regulan negativamente la señalización de TCR. Dentro de este grupo de ICs, están antígeno 4

asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4; del inglés, *cytotoxic T lymphocyte associated-antigen 4*) y proteína 1 de muerte celular programada (PD-1; del inglés, *programmed cell death protein 1*), que son los más estudiados por la aplicación de sus inhibidores en la inmunoterapia de distintos tipos de tumores sólidos, siendo los que vamos a detallar a continuación. Otros ICs inhibitorios de la superfamilia inmunoglobulinas son B7-H3 (CD276), proteína 3 de activación de linfocitos (LAG-3; del inglés, *lymphocyte-activation gene 3*), inmunoglobulina de células T y dominio ITIM (TIGIT; del inglés, *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*), proteína 3-portadora de dominio de mucina (TIM3; del inglés, *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*) y supresor Ig del dominio V de la activación de células T (VISTA; del inglés, *V-domain Ig suppressor of T cell activation*). Además, existe una cantidad de moléculas similares a las estimulantes que pertenecen a la superfamilia TNFR (Wei et al., 2018).

CTLA-4, receptor con actividad inhibitoria de la familia de las inmunoglobulinas, tiene homología estructural con el co-estimulador CD28 y presenta una mayor afinidad que éste por sus ligandos (B7.1 y B7.2) (Figura 7). Una gran cantidad de CTLA-4 se acumula en lisosomas intracelularmente, que se degrada rápidamente; sólo un pequeño grupo de estas moléculas se expresa sobre la superficie de los linfocitos T, en una manera muy dinámica (Iida et al., 2000). Esta distribución está regulada mediante una interacción de la cola citoplasmática de CTLA-4 con AP-1, mediante esta interacción la molécula de CTLA-4 se transporta desde el aparato de *Golgi* hasta la superficie celular (Schneider & Rudd, 2014). El transporte de las moléculas de CTLA-4 a endosomas y lisosomas para su almacenamiento o degradación está mediado por la interacción de CTLA-4 presente en la superficie celular con AP-2, y esta interacción sólo ocurre cuando los residuos de tirosina del dominio intracelular de CTLA-4 no está fosforilado (Valk et al., 2008; Walker & Sansom, 2015). Por lo tanto, CTLA-4 se degrada en ausencia de estimulación. En cambio, la CTLA-4 contenida en los lisosomas se secreta en presencia de activación del TCR, aumentando su expresión en la superficie celular (Chikuma, 2017).

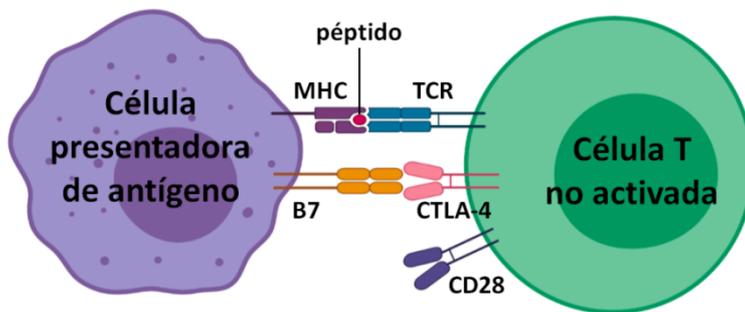


Figura 7. Mecanismo de acción de CTLA-4.

Tras la presentación de un péptido unido a MHC, para la activación de la célula T se requiere una señal co-estimuladora de la unión de CD28 con B7 en la célula presentadora de antígeno. CTLA-4 también se expresa en las células T y compite con la unión entre CD28 y B7, actuando como una señal inhibitoria para la activación de las células T. MHC: moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad; TCR: receptor de células T; B7: ligando de CD28; CTLA-4: antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos; CD28: correceptor estimulador.

Una vez que ha ocurrido el reconocimiento del antígeno, la segunda señal mediada por CD28 conduce a la activación de las células T. En células T post-activación, se induce la expresión de CTLA-4 que desplaza a CD28 de su unión a B7, lo que conduce a una inhibición de la activación de los linfocitos T, frenando su proceso de proliferación y provocando su muerte (Mocellin & Nitti, 2013; Robert, 2020). Además, estudios preclínicos han demostrado que mientras que CD28 estimula la producción de citocinas como IL-2 y regula genes antiapoptóticos como *Bcl-X*, la unión de CTLA-4 a moléculas B7 da como resultado la inhibición de IL-2 (Principe et al., 2021; Wolchok & Saenger, 2008).

PD-1, así como sus dos ligandos, PD-L1 (del inglés, *programmed death-ligand 1*) y PD-L2 (del inglés, *programmed death-ligand 2*), se descubrieron posteriormente. PD-1 es una glicoproteína transmembrana tipo I y se expresa preferentemente en la superficie de células T, células B y macrófagos. Consta de un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular unidos a su cara interna a un motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM; del inglés, *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) y un motivo de cambio del inmunorreceptor basado en tirosina (ITSM; del inglés, *immunoreceptor tyrosine-based switch motif*). Estos dos motivos son reconocidos por fosfatasa de tirosina (SHP-1 y SHP-2), tras la unión de PD-1 al ligando, los cuales son autofosforilados en los residuos de tirosina e interactúan con varios factores de transcripción, dando lugar a la supresión de la activación y proliferación de los linfocitos T

previamente activados (Ghosh et al., 2021).

Con respecto a sus ligandos, se ha observado que PD-L1 se expresa en diferentes tipos celulares, por ejemplo, células T, células B, células dendríticas, macrófagos, así como otras líneas celulares no hematopoyéticas, como células endoteliales y epiteliales. Por el contrario, PD-L2 es expresado en un menor número de células, principalmente en células T, células B, células dendríticas, mastocitos y macrófagos (Okazaki & Honjo, 2007; Robert, 2020; Topalian et al., 2016).

Cuando se analizó la expresión de ligandos de PD-1 en diferentes tipos tumorales, se observó que, en un porcentaje variable de células tumorales (dependiendo del tipo de tumor), había una expresión elevada de PD-L1. En este sentido, mediante la activación del eje PD-1/PD-L1, las células tumorales logran la evasión de la acción del sistema inmune, con las consecuencias para el desarrollo y progresión de los tumores comentada anteriormente (Figura 8) (Blank et al., 2005).

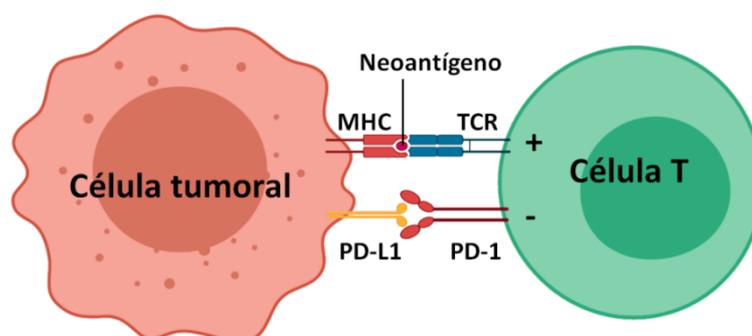


Figura 8. Mecanismo de acción de PD-1/PD-L1.

La célula T reconoce una célula tumoral que expresa un neoantígeno que se le ha presentado previamente. La célula tumoral expresa PD-L1 que se une a PD-1 y actúa como una señal inhibitoria. MHC: moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad; TCR: receptor de células T; PD-1: proteína 1 de muerte celular programada; PD-L1: ligando 1 de muerte programada.

En base al conocimiento que se ha adquirido en las últimas décadas sobre el funcionamiento de estos ICs, se han desarrollado agentes terapéuticos basados en la modulación de estos puntos de control, los denominados bloqueantes de ICs (ICBs) que se abordarán en detalle en el apartado de “5.2. BLOQUEANTES DE LOS PUNTOS DE CONTROL INMUNE” (Haanen & Robert, 2015).

4. CÁNCER DE PULMÓN

4.1. EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer representa un problema de salud pública de enorme magnitud. Entre ellos, la incidencia del cáncer de pulmón está aumentando a nivel mundial y es la causa más común de muerte por cáncer a nivel global (Siegel et al., 2021; Sung et al., 2021). De acuerdo a los datos GLOBOCAN 2020, los tres tipos de cáncer más frecuentes en ambos sexos son: cáncer de mama (2.261.419, 11,7% del total), cáncer de pulmón (2.206.771, 11,4%) y cáncer colorrectal (1.931.590, 10%). Además, la mortalidad por cáncer de pulmón es la más alta, representando el 18% del total de fallecidos por cáncer en el año 2020 (Figura 9) (Sung et al., 2021).

El consumo de productos de tabaco es la causa principal de cáncer de pulmón; el 55% de las muertes por cáncer de pulmón en mujeres y más de 70% en hombres se deben al tabaquismo (O’Keeffe et al., 2018). El riesgo se incrementa en función de la duración de la exposición, la cantidad de cigarrillos consumidos por día y el grado de inhalación (Gemine et al., 2019; Tindle et al., 2018). El humo del tabaco contiene aproximadamente 5000 sustancias químicas, incluyendo al menos 69 que se consideran carcinógenas (Greillier et al., 2018; Sasco et al., 2004).

Adicionalmente, la exposición ambiental o laboral a ciertos agentes carcinógenos como arsénico, asbesto, el gas de radón, etc. también se ha propuesto como posible modulador del riesgo en el desarrollo del cáncer de pulmón. Otros factores de riesgo asociados a este tipo de cáncer son: dieta rica en grasas saturadas, la mala alimentación, la contaminación del aire, agentes infecciosos y otras enfermedades como la fibrosis quística difusa (Malhotra et al., 2016; Markowitz et al., 2013).

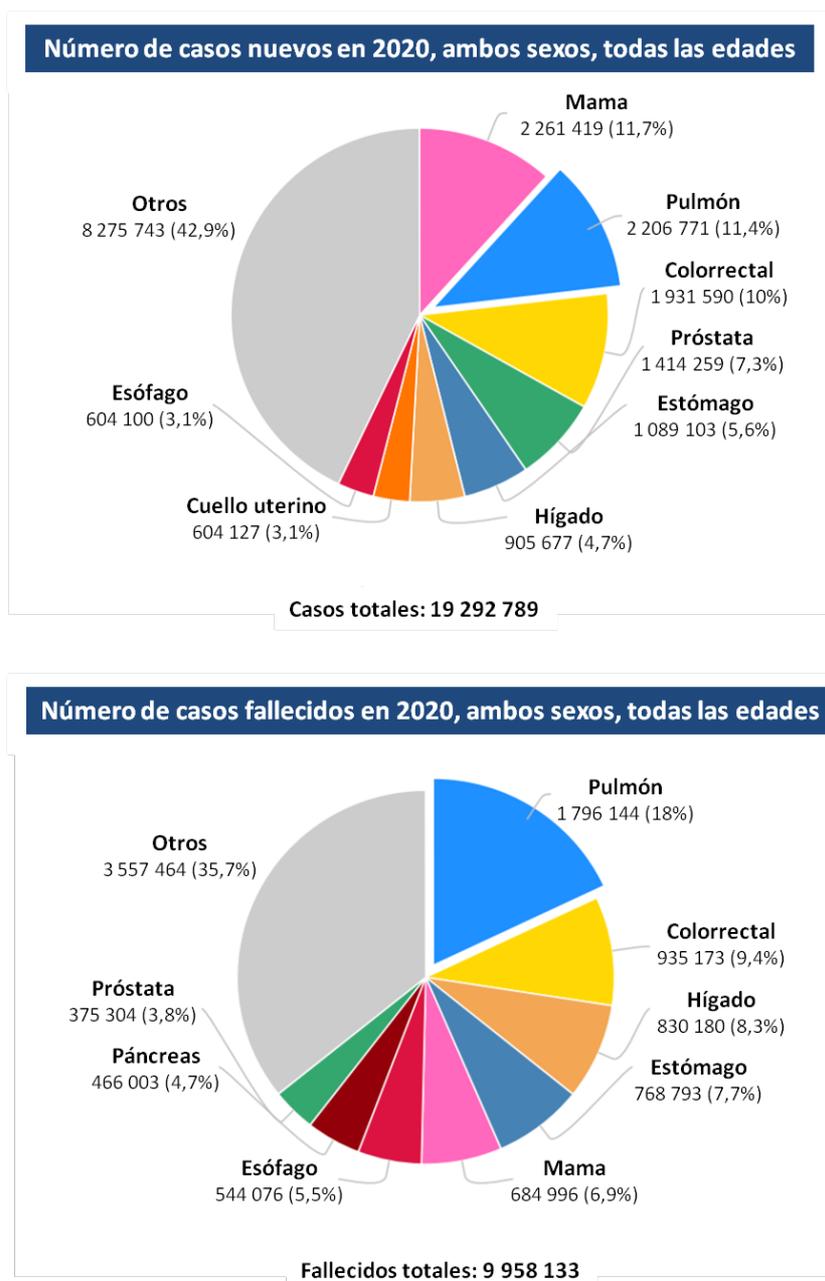


Figura 9. Incidencia y mortalidad estimadas de los tumores más frecuentes en el año 2020 a nivel mundial. Adaptado y traducido de Sung et al., 2021.

Arriba, incidencia, ambos sexos, todas las edades; abajo, mortalidad, ambos sexos, todas las edades.

4.2. DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN

La determinación del estadio del cáncer de pulmón es un factor clave para definir el tratamiento y obtener información pronóstica relevante. Actualmente, la estadificación se basa en el sistema de tumor-nódulos-metástasis (TNM), el cual describe la extensión anatómica de los tumores en términos de 3 componentes: tamaño del tumor primario (T),

INTRODUCCIÓN

ausencia o presencia y extensión de metástasis en ganglios linfáticos regionales (N), y metástasis a órganos distantes (M) (Tabla S1). La combinación de los tres componentes define los estadios de la enfermedad, utilizándose actualmente la octava edición del sistema TNM de cáncer de pulmón de IASLC (del inglés, *International Association for the Study of Lung Cancer*) publicada en el año 2017 (Tabla S2) (Detterbeck et al., 2017). La información pronóstica del TNM está asociada con el estadio, siendo menor la supervivencia global (SG) a medida que aumenta el estadio tumoral (Yang et al., 2017).

Es de destacar que, debido a la presentación tardía de síntomas en este tipo de tumores (Latimer, 2018), alrededor del 75% de los pacientes se diagnostican en estadios avanzados de la enfermedad (IIIB o superior), lo que limita su pronóstico con una supervivencia a un año de sólo el 15–19% en comparación con el 81–85% para el estadio I (Blandin Knight et al., 2017).

Adicionalmente, las alteraciones moleculares presentes en los tumores también deberían tenerse en cuenta en el momento de valorar el pronóstico de cada paciente aparte del TNM. De manera que, en un futuro cercano, se podrá tener una estimación mucho más ajustada de la supervivencia de cada paciente teniendo en cuenta una combinación de la estadificación TNM y el perfil molecular del tumor.

4.3. CLASIFICACIÓN

Dependiendo de las características histológicas, se realiza una primera clasificación del cáncer de pulmón en dos grandes grupos (Barta et al., 2019; Travis, 2020):

- **Carcinomas de células pequeñas de pulmón (20%):** Su nombre deriva del tamaño de sus células. Estas células de origen neuroendocrino se caracterizan por tener escaso citoplasma, núcleos redondos y cromatina densa. Estos tumores tienen generalmente una localización en la zona central de los pulmones y presentan una alta agresividad.
- **Carcinomas no microcíticos o de células no pequeñas de pulmón (CPNM) (80%):** Generalmente se origina a partir de las células del epitelio bronquial. Su crecimiento es

relativamente lento y presenta una sensibilidad baja a quimioterapia y radioterapia.

Los tres subtipos histológicos predominantes dentro de este grupo son los siguientes (Figura 10): carcinoma de células escamosas o epidermoides (SCC; del inglés, *squamous cell carcinoma*) (40%), adenocarcinoma (ADC) (30%) y carcinoma de células grandes (LCC; del inglés, *large-cell carcinoma*) (10%) (Chen et al., 2014).

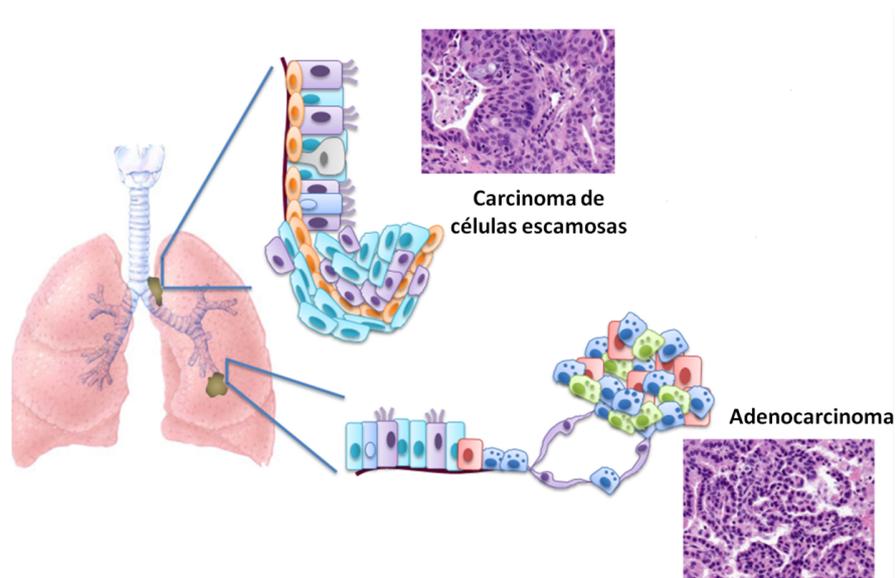


Figura 10. Subtipos histológicos más frecuentes del cáncer de pulmón de células no pequeñas. Adaptado y traducido de Chen et al., 2014.

Carcinoma de células escamosas suele localizarse en la vía aérea central, en zonas del epitelio sometidas a daño o inflamación crónica, y es el tipo celular con más tendencia a la necrosis en su interior y se caracteriza por la queratinización. Mientras que el adenocarcinoma se origina en zonas más periféricas de los pulmones sobre cicatrices o en regiones con fibrosis intersticial, por lo que afecta más a la pleura y pared torácica.

En la última década, se han logrado avances significativos en la caracterización de las alteraciones moleculares en el CPNM (Rozenblum et al., 2017). Cada subtipo histológico se caracteriza por presentar perfiles genéticos distintos según se muestra en la Figura 11 (Bubendorf et al., 2017; Pakkala & Ramalingam, 2018). La implementación de análisis moleculares en el contexto diagnóstico en cáncer de pulmón tiene gran utilidad para tomar las decisiones terapéuticas, sobre todo en el caso de las terapias anti-diana y más actualmente para los tratamientos de base inmunológica.

INTRODUCCIÓN

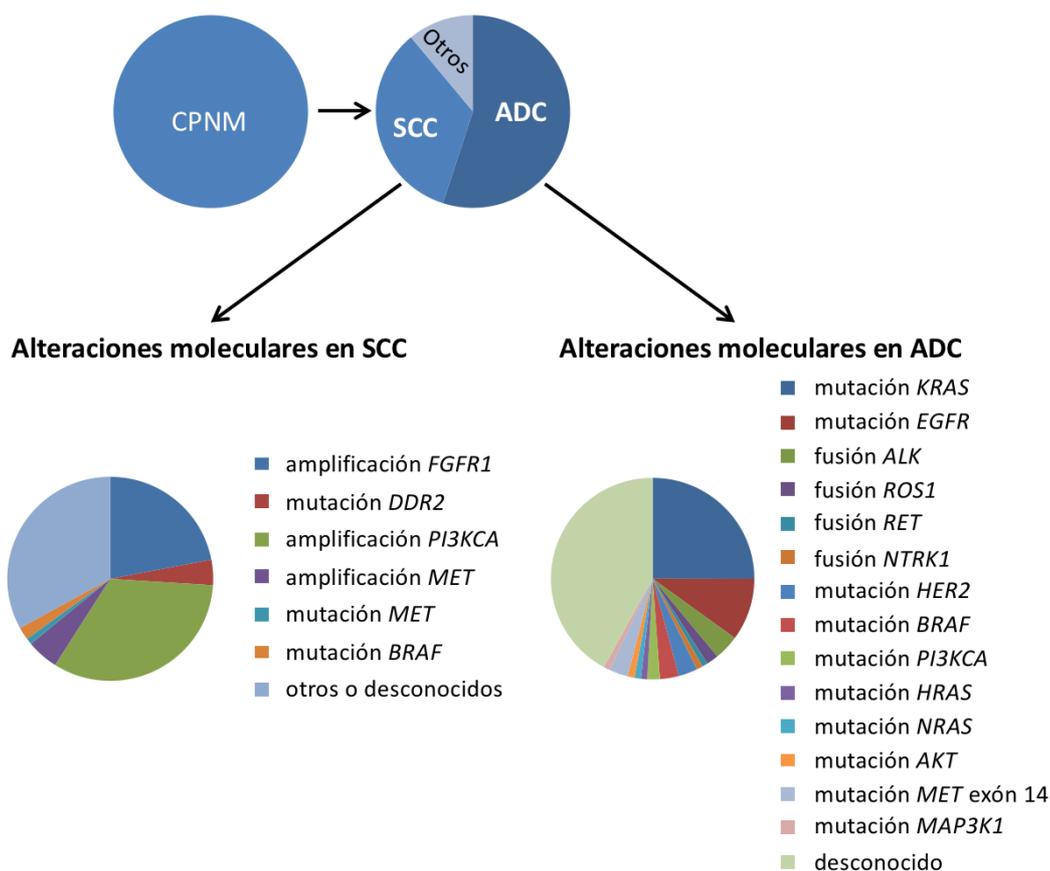


Figura 11. Alteraciones moleculares en los subtipos histológicos de CPNM. Adaptado y traducido de Bubendorf et al., 2017.

CPNM: cáncer de pulmón no microcítico; SCC: carcinoma de células escamosas; ADC: adenocarcinoma.

4.4. TRATAMIENTO

Las opciones terapéuticas para el CPNM van desde opciones convencionales como la cirugía, radioterapia o quimioterapia, hasta las nuevas aproximaciones terapéuticas que llegaron de la mano de la Oncología de Precisión que incluyen a las terapias dirigidas contra dianas específicas y a la inmunoterapia.

Para los estadios tempranos (estadios I-II y casos seleccionados en estadio IIIA), la resección quirúrgica completa del tumor es la opción terapéutica que tiene intención curativa, aunque existe un porcentaje no desdeñable de pacientes que recaen. En cuanto a los pacientes con CPNM irresecable localmente avanzado, las opciones de tratamiento estándar son la radioterapia o quimioradioterapia (Goldstraw et al., 2016).

En los pacientes con enfermedad avanzada, las opciones de tratamiento son

generalmente sistémicas e incluyen: quimioterapia, radioterapia, terapias dirigidas e inmunoterapia. Sin dudas, en el CPNM avanzado, en las últimas dos décadas se ha producido un cambio de paradigma, lográndose importantes avances en supervivencia en grupos seleccionados de pacientes que demuestran que los esfuerzos en la caracterización molecular de los tumores redundan en un beneficio real para los pacientes (Herbst et al., 2018).

La terapia molecular dirigida es hoy la primera elección de tratamiento para los pacientes con CPNM en estadios avanzados cuyos tumores presentan mutaciones en oncogenes *drivers*, debido a su alta eficacia y reducida toxicidad (Planchard et al., 2018; Yuan et al., 2019). Se utilizó inicialmente a finales de la década de 1990 con la introducción de gefitinib, un inhibidor de tirosina quinasa (ITK) específica de *EGFR*, y se lograron un beneficio importante en la gran mayoría de los pacientes con mutaciones activadoras de *EGFR*. Desde entonces, el potencial de alteraciones genéticas en los genes diana como *EGFR*, *KRAS*, *ALK*, *MET*, *RET*, *BRAF*, *ROS1*, *NTRK1*, *MEK1*, *PI3KCA* y *HER2* han llevado al desarrollo de terapias dirigidas efectivas (Roskoski, 2020; Yuan et al., 2019).

Además de las terapias dirigidas, la inmunoterapia, en particular los ICBs, ha abierto nuevos horizontes mejorando notablemente los resultados clínicos en pacientes con CPNM avanzado sin mutaciones en genes diana y que se desarrollan en detalle a continuación.

5. INMUNOTERAPIA

5.1. GENERALIDADES

En los últimos años, la inmunoterapia ha cambiado el paradigma de tratamiento en el cáncer de pulmón, pasando a ser el tratamiento de primera línea en cáncer avanzado en un subgrupo importante de pacientes. Entre estas diferentes aproximaciones en inmunoterapia, el uso de los ICBs fue el punto de inflexión que demostró beneficios notables en supervivencia en varios tipos de tumores, motivo por el que la revista *Science* eligió a este

INTRODUCCIÓN

tipo de tratamientos como el “avance del año” en 2013 (Couzin-Frankel, 2013) seguido del reconocimiento con el Premio Nobel para los científicos Tasuku Honjo y James Allison por sus trabajos sobre PD-1 y CTLA-4, respectivamente (Altmann, 2018).

De modo general, se puede decir que la inmunoterapia se basa en la modulación de la función del sistema inmunológico aumentando su eficacia para atacar a las células cancerosas y detener o retrasar su crecimiento (Osmani et al., 2018). Sin embargo, estos tratamientos no funcionan de manera uniforme en todos los tumores y la clave se encuentra en el análisis detallado de las características de los TMEs de cada uno de ellos. Según Sharma y Allison, los tumores podrían categorizarse de manera global en dos grandes grupos: i) inflamados y ii) no-inflamados (Sharma & Allison, 2015).

Los tumores inflamados son aquellos que evidencian respuesta inmune antitumoral espontánea, caracterizada por la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs; del inglés, *tumor-infiltrating lymphocytes*) en el TME posiblemente relacionados con la alta carga mutacional tumoral (TMB; del inglés, *tumor mutation burden*) e inestabilidad genómica y se asocian con una mejor respuesta a fármacos inmunoterápicos y supervivencias más prolongadas, en algunos casos estos tumores también expresan niveles elevados de PD-L1 en células tumorales y en células inmunes. En contraste, los tumores no-inflamados se caracterizan por estar muy pobremente infiltrados, raramente expresan PD-L1 y se caracterizan por tener mayor capacidad de proliferación y baja TMB (Duan et al., 2020; Trujillo et al., 2018).

Existen varios tipos de inmunoterapia. Incluyen los siguientes (Stanculeanu et al., 2016):

- Terapia con vacunas: consiste en la introducción de células tumorales inactivas, partes de las mismas o simplemente antígenos para que los linfocitos los reconozcan, restaurando la función del sistema inmunitario.
- Terapia con citocinas: mediante la generación o la activación de citocinas (proteínas), elimina las células tumorales o evita que se multipliquen, previene o controla efectos secundarios de algunos tratamientos.

- Anticuerpos monoclonales: son proteínas que permiten reconocer de forma específica las células tumorales, con la finalidad de bloquear las señales de crecimiento tumoral, eliminar las células tumorales, o bien transportar otros medicamentos directamente hasta el tumor.
- ICBs: es un tipo de inmunoterapia que ya está aprobada para el uso de muchos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de pulmón. De estos inhibidores lo que consigue es modular los ICs y estimular la función antitumoral del sistema inmunológico.
- Terapia CAR-T o terapia de linfocitos con receptor de antígeno quimérico: consiste en extraer linfocitos T de la persona con cáncer para modificarlos en el laboratorio, añadiéndoles un nuevo receptor que permitirá reconocer ciertas células tumorales, y devolverlas al cuerpo para que sea capaz de eliminar o controlar el tumor.
- Terapia con células TILs: es una modalidad similar a la anterior a la terapia CAR-T, diferenciándose en que los linfocitos extraídos son los TILs para crear más cantidad en el laboratorio e inyectar los de nuevo. Dicho de otra manera, es un autotrasplante de células TILs.
- Virus oncolíticos: es una de las estrategias más novedosas, caracterizado por la inyección al tumor de los tipos de virus que son capaces de penetrar en las células tumorales y destruirlas sin dañar a las células sanas.

En este estudio, nos hemos centrado en la inmunoterapia basada en ICBs, que se describe a continuación.

5.2. BLOQUEANTES DE LOS PUNTOS DE CONTROL INMUNE

Gracias al conocimiento sobre la función de los receptores con función de puntos de control en los linfocitos, se pensó que la inhibición de la señalización de los receptores con actividad inhibitoria podría causar la reactivación de los linfocitos T capaces de reconocer neoantígenos tumorales y, de esta manera, surgieron los anticuerpos bloqueantes dirigidos a: i) CTLA-4 que actúan a nivel de la presentación antigénica en los órganos linfoides

INTRODUCCIÓN

secundarios y ii) eje PD-1/PD-L1 cuya función consiste en un desbloqueo de los linfocitos T a nivel local, en el TME (Figura 12) (Doroshov et al., 2019).

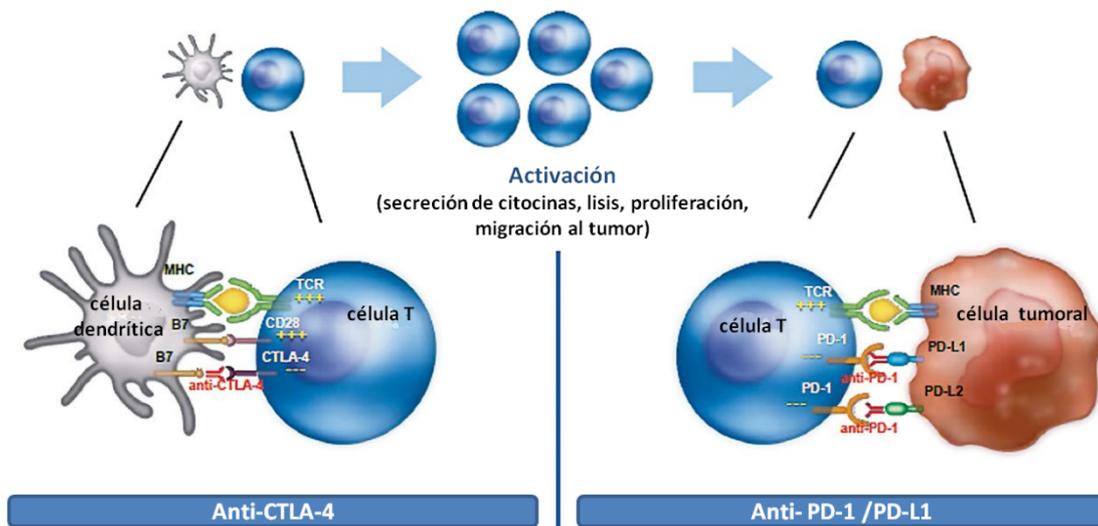


Figura 12. Mecanismo de acción de los ICBs anti-CTLA-4 y anti-PD-1/PD-L1. Adaptado y traducido de Hassel et al., 2017.

MHC: moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad; TCR: receptor de células T; CD28: correceptor estimulador; B7: ligando de CD28; CTLA-4: antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos; PD-1: proteína 1 de muerte celular programada; PD-L1: ligando 1 de muerte programada; PD-L2: ligando 2 de muerte programada.

El primer anticuerpo monoclonal desarrollado fue contra CTLA-4, Ipilimumab, para el tratamiento de pacientes con melanoma metastásico, presentando mejoras en las tasas de SG, pero un grado de eventos adversos no despreciable (Hodi et al., 2010).

Posteriormente se desarrollaron anticuerpos monoclonales completamente humanizados para bloquear la interacción PD-1/PD-L1. En comparación con el bloqueo de CTLA-4, el bloqueo del eje PD-1/PD-L1 presenta una acción más específica sobre los linfocitos T con función antitumoral, produciendo menos eventos adversos (Ribas, 2012). Actualmente, los anticuerpos monoclonales dirigidos al receptor PD-1 (pembrolizumab y nivolumab) o su ligando PD-L1 (atezolizumab, durvalumab y avelumab) han sido evaluados y aprobados para el tratamiento de pacientes con CPNM avanzado en primera y segunda línea (Majem et al., 2019; Planchard et al., 2018). En la Figura 13 se muestra el esquema de tratamiento utilizado actualmente en España para los pacientes con CPNM en estadios avanzados sin mutaciones *driver* (Majem et al., 2019).

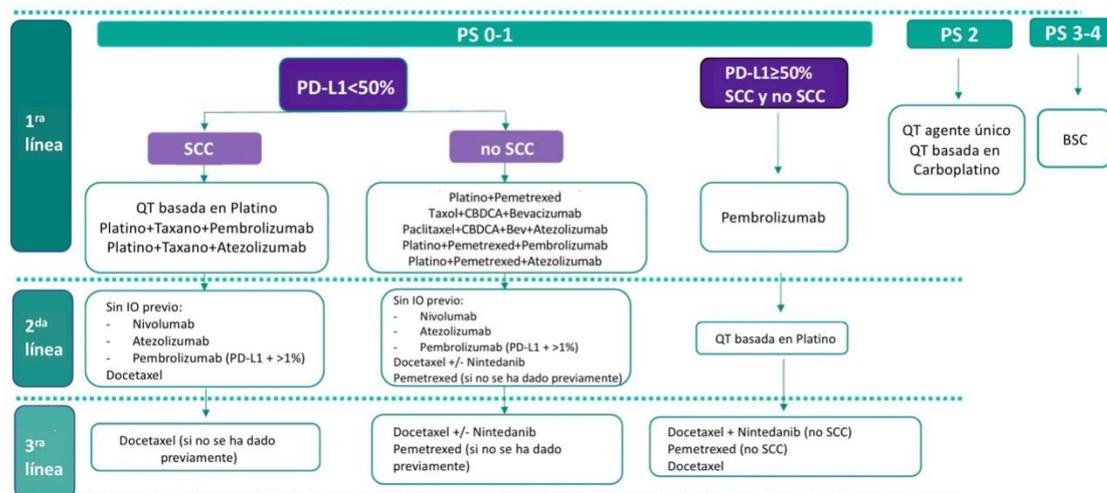


Figura 13. Esquema de tratamiento para el CPNM en estadios avanzados sin mutaciones *driver*. Adaptado y traducido de Majem et al., 2019.

PS: estado funcional; SCC: carcinoma de células escamosas; QT: quimioterapia; IO: inmunoterapia; BSC: mejor atención de apoyo.

En particular, pembrolizumab ha demostrado tener una importante eficacia antitumoral en la práctica clínica. El estudio KEYNOTE-024 de fase III ha establecido este inhibidor como tratamiento de primera línea en pacientes con CPNM en estadio IV sin mutaciones *driver* cuyos tumores expresan PD-L1 en niveles de 50% o más, con aumento en tasas de respuesta (45% vs. 28%), SLP y SG y mejoras en la calidad de vida de los pacientes en comparación con la quimioterapia estándar (Brahmer et al., 2017). El seguimiento continuo ha enfatizado aún más la efectividad de pembrolizumab, con una mediana de SG duplicada (30 vs. 14 meses) en aquellos pacientes que recibieron pembrolizumab que quimioterapia (Reck et al., 2019).

Recientemente, los resultados del estudio sobre la combinación de inmunoterapia con quimioterapia han aportado nuevas opciones para las aproximaciones terapéuticas en primera línea de CPNM, independientemente de la expresión de PD-L1. En CPNM metastásico no escamoso, la adición de pembrolizumab a quimioterapia ha demostrado una mejor supervivencia libre de progresión (SLP) y SG en comparación con la quimioterapia en todos los subgrupos de expresión de PD-L1 (Gandhi et al., 2018). Asimismo, la combinación de quimioterapia más pembrolizumab se ha asociado con tasas de respuesta superiores (58,4% vs. 35%) y una mejor SG en pacientes con CPNM escamoso en estadios avanzados (Paz-Ares et al., 2018). Con respecto a atezolizumab combinado con quimioterapia, también

INTRODUCCIÓN

mostraron una mayor SLP y SG en comparación con la quimioterapia (Socinski et al., 2018; West et al., 2019).

No obstante, un alto porcentaje de pacientes no se benefician de este tipo de tratamiento (resistencia primaria), mientras otros presentan progresión tras un periodo de respuesta (resistencia adquirida) (Fares et al., 2019). Debido a la heterogeneidad en las respuestas, la identificación de biomarcadores predictivos y/o pronósticos para dirigir la decisión terapéutica es una necesidad actual para seleccionar los pacientes que se beneficiarán de la ICBs terapia a mejorar el control de enfermedad, minimizar los eventos adversos y reducir los costos.

6. BIOMARCADORES

Un biomarcador es cualquier característica que puede medirse o evaluarse para identificar un proceso fisiológico o patológico, o bien de indicar una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica (Wu & Qu, 2015). El biomarcador ideal debe ser altamente sensible, específico, fácil de medir, económico, seguro y repetible durante el seguimiento o tratamiento. También debe demostrar suficiente relevancia preclínica y clínica como para modificar en ciertos casos las decisiones relativas al proceso patológico en el que se aplica (Ludwig & Weinstein, 2005).

6.1. BIOMARCADORES EN CÁNCER

Los biomarcadores en cáncer pueden clasificarse de acuerdo a la información que proveen en: valoración de riesgo, diagnóstico, pronóstico, predictores de respuesta al tratamiento, farmacocinéticos, marcadores para monitorizar el tratamiento o los que permiten objetivar recurrencia de la enfermedad o resistencia a las terapias (Henry & Hayes, 2012).

Para la implementación en la práctica clínica de la Oncología de Precisión, es

imprescindible poder identificar biomarcadores con valor pronóstico y sobre todo predictivos de respuesta. La distinción entre estos dos tipos de marcadores en oncología no siempre es fácil. Los biomarcadores pronósticos proporcionan información sobre la evolución de la enfermedad independientemente del tratamiento que haya recibido cada paciente, mientras que los marcadores predictivos son los que permiten seleccionar a aquellos pacientes que con mayor probabilidad se beneficiarán de recibir un determinado tratamiento, por lo que es un indicador del efecto de un fármaco sobre la evolución del tumor (Yang et al., 2019). En este trabajo, uno de los objetivos principales es la búsqueda de nuevos biomarcadores en el campo de la inmunoterapia.

6.2. BIOMARCADORES EN INMUNOTERAPIA: SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En la actualidad, el nivel de expresión de PD-L1 en células tumorales y/o células inmunes infiltrantes del tumor se ha correlacionado con la respuesta a los inhibidores del eje PD-1/PD-L1 y se considera como el biomarcador más implementado para la selección de pacientes (Herbst et al., 2016; Reck et al., 2016; Sacher & Gandhi, 2016). En el año 2017, la determinación de expresión PD-L1 fue aprobada por Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA; del inglés, *Food and Drug Administration*) para el uso clínico en pacientes con CPNM (Pai-Scherf et al., 2017). No obstante, existen evidencias de que muchos pacientes cuyas células tumorales expresan niveles elevados de PD-L1 presentan una respuesta deficiente, mientras que los pacientes con niveles bajos o indetectables de PD-L1 presentan un beneficio clínico duradero a las terapias anti-PD-1/anti-PD-L1 (Gibney et al., 2016; Grigg & Rizvi, 2016). Estas discrepancias pueden ser resultados de varias causas, por ejemplo, la variabilidad de los ensayos de inmunohistoquímica disponible, y la heterogeneidad intratumoral espacial y temporal de la expresión de PD-L1, entre otros (S. Lu et al., 2019). Por lo tanto, la prueba de PD-L1 por sí sola se ha visto limitada en la práctica clínica de rutina y es crítico continuar trabajando en la búsqueda de biomarcadores para definir los pacientes que se beneficiarán.

INTRODUCCIÓN

Recientemente, los biomarcadores adicionales, sobre todo, la TMB y la alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H; del inglés *microsatellite instability-high*), han demostrado ser predictivos de la respuesta a la inmunoterapia y también han sido reconocidos por la FDA como biomarcadores predictivos de la respuesta a los ICBs (Bai et al., 2020; Marcus et al., 2019; Subbiah et al., 2020).

TMB se define como el número de mutaciones somáticas sinónimas y no sinónimas por megabase de DNA analizado. Las alteraciones moleculares no sinónimas conducen a la transcripción de proteínas anormales, que son reconocidas por el sistema inmune como neoantígenos y hacen que el tumor sea altamente inmunogénico. Múltiples estudios han confirmado que una mayor TMB se correlaciona con una respuesta objetiva a ICBs (Goodman et al., 2017; Hellmann et al., 2019; Marabelle et al., 2020; Rooney et al., 2015; Yarchoan et al., 2017b). Sin embargo, algunas limitaciones, como la ausencia de estandarización de la TMB según las histologías tumorales, no correlación consistente con la SG y la evidencia de que este biomarcador no se correlaciona de manera lineal con la carga de neoantígenos, resaltan que el valor predictivo de TMB para la inmunoterapia debe confirmarse en estudios más precisos (Sesma et al., 2020).

La carga neoantigénica tumoral, la cantidad de mutaciones que realmente se dirigen a las células T, puede estar directamente relacionada con la respuesta a ICBs (Jiang et al., 2019; McGranahan et al., 2016; Yi et al., 2018). Estos neoantígenos deben ser inmunogénicos para inducir la respuesta inmune específica antitumoral, presentándose en el contexto de las MHC y reconocidos por los TCR de las células T. Actualmente, la carga neoantigénica se estima en función de la TMB (Chen & Mellman, 2017). Aunque la TMB y la carga de neoantígenos han mostrado asociaciones con la respuesta de ICB, no se han validado de forma independiente para predecir la respuesta (McGranahan et al., 2016; Tray et al., 2018). Además, estos ensayos son difíciles de realizar en la práctica diaria considerando el costo y los requisitos bioinformáticos involucrados en la secuenciación del exoma completo y la predicción de neoepítomos (Tray et al., 2018).

Por otra parte, se ha demostrado que los pacientes con tumores de MSI-H/deficientes

en la reparación por mismatch (dMMR; del inglés *deficient mismatch repair*) pueden beneficiarse de la inmunoterapia (Sidaway, 2020). Esta correlación se informó por primera vez en cáncer colorrectal y después se han observado resultados similares en otros tipos de cáncer (Le et al., 2015). Los tumores MSI-H/dMMR contienen mutaciones en genes que codifican para proteínas que afectan a la correcta reparación del DNA. Debido al gran número de mutaciones somáticas, los tumores MSI-H/dMMR tienen mayor TMB y expresan una gran cantidad de neoantígenos, lo que potencialmente los vuelve más susceptibles a la inmunoterapia (Marcus et al., 2019; Yarchoan et al., 2017b).

Debido a que los biomarcadores existentes no son perfectos para la selección de pacientes que beneficiarán de la inmunoterapia, la búsqueda de los posibles biomarcadores adicionales sigue siendo importante. Entre otros, las características de la microbiota intestinal, el grado de TILs, la carga neoantigénica tumoral y el repertorio de TCR pueden tener mayor relevancia.

En cuanto al valor de los TILs como biomarcadores, una alta densidad de TILs se ha postulado como un marcador de respuesta, debido a que indicaría un mayor reconocimiento de las células tumorales por el sistema inmunológico, lo que previamente indicamos como TME inflamado que se relaciona con más sensibilidad a los ICBs. Se han relacionado niveles altos de TILs CD8+ y CD4+ con un mejor pronóstico en una variedad de cáncer (Alifano et al., 2014; Brambilla et al., 2016; Donnem et al., 2016; Koh et al., 2015; Schalper et al., 2015; Zeng et al., 2016). En cuanto al CPNM, en nuestro grupo de investigación se han observado que la presencia de células CD8 + en el compartimento tumoral se asocia con un mejor curso clínico, mientras que la presencia de células FOXP3+ (marcador de células Tregs) se relaciona con un menor tiempo a la recaída y SG (Usó et al., 2016). Sin embargo, el análisis de TILs en el TME aún no es un biomarcador implementado en la clínica y se necesitan más estudios para definir y estandarizar los valores de corte y sobre todo la forma de cuantificar el grado de infiltración linfocitaria en el tumor (Gibney et al., 2016).

En relación con este último punto, el estudio del repertorio de linfocitos T, a través de la secuenciación del TCR permitiría tener información más precisa sobre la población de

INTRODUCCIÓN

linfocitos que son capaces de reconocer antígenos tumorales y por lo tanto podría incorporarse al arsenal de biomarcadores predictivos para ICBs en estudio (Aversa et al., 2020; Zhuang et al., 2019). Cabe señalar que la mayoría de los biomarcadores presentados son biomarcadores estáticos evaluados solamente previo al inicio de la terapia, lo que limita su efectividad debido a la plasticidad característica de los tumores. Por lo tanto, para valorar dinámicamente los cambios durante el transcurso de la enfermedad, se requieren enfoques alternativos. La biopsia líquida basada en muestras mínimamente invasivas, como la sangre periférica, puede ser una herramienta potencial para recapitular mejor la heterogeneidad tumoral y solucionar la dificultad de obtener biopsias tumorales en los pacientes en estadios avanzados (Quandt et al., 2017). Considerando estas premisas, este estudio se centra en el estudio del repertorio TCR en sangre periférica y su relación con la respuesta a los tratamientos inmunoterápicos.

7. NUEVOS BIOMARCADORES EN INMUNOTERAPIA: TCR

El reconocimiento de los antígenos tumorales por parte de los linfocitos T es un paso clave para una función eficaz de los ICBs, por lo tanto, el análisis del repertorio de los linfocitos T podría ser una nueva posibilidad en la búsqueda de biomarcadores más eficaz. Como cada TCR en la superficie de un linfocito T es único, el perfil de linfocitos involucrados en la acción antitumoral presenta su propio repertorio de receptor. Así, la caracterización del repertorio TCR permitiría determinar si los neoantígenos presentados en las células tumorales van a ser reconocidos por el sistema inmune.

7.1. ESTRUCTURA DEL TCR

El TCR es una proteína heterodímera, formada por dos polipéptidos unidos por un enlace disulfuro y anclados a la membrana por una pequeña porción transmembrana y una cola citoplasmática muy corta. Hay dos tipos de TCR definidos por la naturaleza de las cadenas heterodiméricas que lo forman, $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ (Dong et al., 2019; Matos et al., 2017). En

los seres humanos, alrededor del 95% de la población total de células T consisten en cadenas α y β (Figura 14) y por lo tanto, en este trabajo nos centraremos en este tipo de receptores. Las células T $\alpha\beta$ reconocen los antígenos presentados en asociación con las proteínas del MHC Clase I y Clase II, controlando y regulando el tipo y magnitud de la respuesta inmune específica (De Simone et al., 2018).

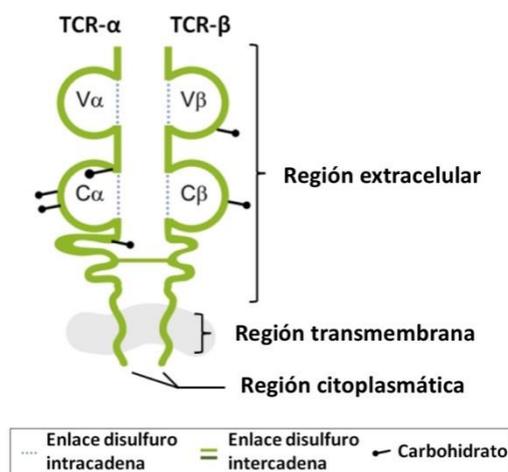


Figura 14. Estructura de TCR. Adaptado y traducido de Mak, Saunders, & Jett, 2014.

La región extracelular (formada por el dominio variable (V) y el dominio constante (C)), transmembrana y citoplasmática, así como los enlaces disulfuro están indicados. TCR: receptor de células T.

Como se muestra en la Figura 14, la región extracelular de cada cadena del TCR está compuesta por un dominio constante (C) en el lado intracelular y un dominio variable (V) en la cara extracelular del receptor: el dominio V contiene el sitio de unión al antígeno y los aminoácidos del sitio de unión establecen el contacto tanto con el péptido antigénico como con la molécula de MHC unida a él; mientras que el dominio C tiene una secuencia relativamente invariante (Mak et al., 2014).

Para la transmisión de las señales de activación después de la unión del péptido, el heterodímero de TCR debe asociarse de forma no covalente con una colección de proteínas transmembrana invariantes conocidas como el conjunto de CD3, formando el complejo receptor TCR/CD3 (Figura 15) (Franco et al., 2016; Mak et al., 2014). De modo que las diferentes células T reconocen péptidos específicos, y se activarán y expandirán frente a antígeno endógeno o exógeno, conduciendo a una distribución clonal del repertorio de TCR (Dong et al., 2019; Matos et al., 2017).

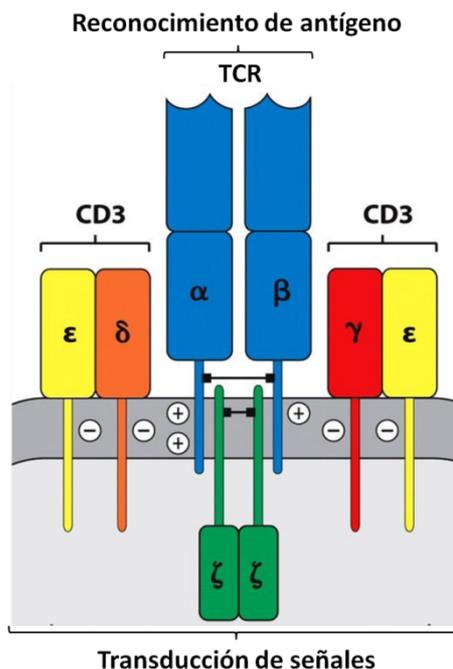


Figura 15. Complejo receptor TCR/CD3. Adaptado y traducido de Franco et al., 2016.

El complejo CD3 está formado por un heterodímero CD3εδ, un heterodímero CD3γε y un homodímero CD3ζζ; juntos, forman el complejo TCR/CD3.

7.2. GENERACIÓN DEL REPERTORIO TCR

Los TCRs están codificados a partir del reordenamiento de segmentos génicos de tipo V (variable), D (de diversidad), J (de unión) y C (constante). La cadena polipeptídica β de TCR está codificada por los loci TCRB ubicados en el cromosoma 7; mientras que la cadena α está codificada por los loci TCRA en el cromosoma 14. La familia TCRA posee segmentos V, J y C, mientras que la familia TCRB contiene V, D, J y C (Mak et al., 2014).

La recombinación V(D)J consiste en la selección aleatoria de fragmentos de cada clase que se combinan para formar la secuencia que codifica para el dominio V; posteriormente, a través de un proceso de corte y empalme, un segmento C se une para formar el dominio C (Figura 16 A) (Kirsch et al., 2015).

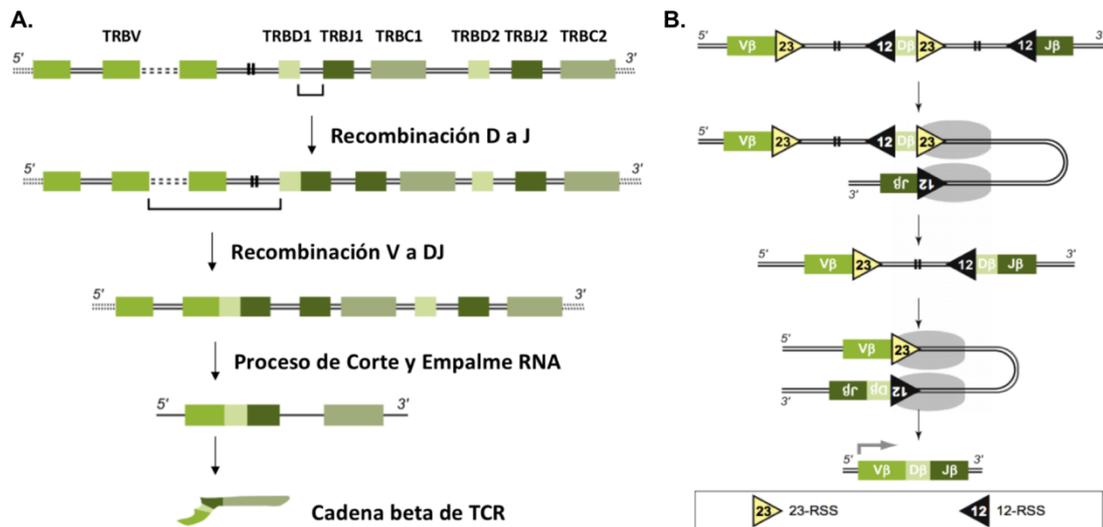


Figura 16. Recombinación V(D)J. A. Proceso de recombinación V(D)J. B. Regla 12/23. Adaptado y traducido de Kirsch et al., 2015.

(A) En la recombinación V(D)J, primero ocurre la recombinación de segmentos D y J, y luego la recombinación V al segmento DJ ya reordenado para formar el segmento VDJ. Después de añadir el fragmento C, se obtiene un transcrito que codifica para la cadena TCR-β. En (B) se muestra la regla basada en secuencias señal de recombinación (RSS), con la finalidad de asegurar que los segmentos V, D y J se unan en el orden adecuado, evitándose las uniones "ilegítimas" entre segmentos del mismo tipo. Las RSS se encuentran flanqueando los segmentos V, D y J. En el extremo 3' del segmento V o D, la RSS, conocida como 23-RSS, está compuesto por un heptámero, seguido por un espaciador de 23 nucleótidos y un nonámero; mientras que la secuencia RSS en el extremo 5' del segmento D o J, llamada como 12-RSS, está formada por un heptámero, un espaciador de 12 nucleótidos y un nonámero. La recombinación V(D)J sólo ocurre entre segmentos con el terminal 23 RSS y segmento con el terminal 12 RSS.

El proceso de recombinación V(D)J es dependiente de la presencia de secuencias señal de recombinación (RSS; del inglés *recombination signal sequences*) que se encuentran flanqueados por cada uno de los segmentos génicos V, D y J. Solo se recombinan de manera eficiente cuando dos RSS no sean idénticas, y esto se conoce como la regla 12/23 de la recombinación (Figura 16 B). Las recombinasas RAG-1 y RAG-2 reconocen las secuencias RSS e inducen el inicio de la recombinación V(D)J. Después de que las dos RSS y los segmentos adyacentes correspondientes se alineen y queden en mutua proximidad, se produce la escisión de la doble hebra, liberando la secuencia entre estos segmentos codificadores. La rotura de la doble hebra activa la vía de reparación del DNA mediante la recombinación no homóloga. La endonucleasa Artemis se recluta y se utiliza para abrir las horquillas en los extremos codificantes. Cuando la apertura es asimétrica, se generan extremos cohesivos y los nucleótidos complementarios, que son los nucleótidos P, se incorporan al azar mediante

INTRODUCCIÓN

la acción de enzimas reparadoras. Por otro lado, cuando la apertura es simétrica, se producen extremos romos, que mediante la acción de la desoxinucleotidil terminal-transferasa (TdT), incorpora hasta 20 nucleótidos aleatorios sin molde, conocidos como nucleótidos N. Además, los nucleótidos se pueden eliminar por la acción de Artemisa. Por tanto, la diversidad se genera entre las uniones de los segmentos antes de unirse entre sí (Mansilla-Soto & Cortes, 2003).

Así, la diversidad de los TCR se genera a través de las combinaciones aleatorias de segmentos génicos y la adición o eliminación aleatoria de nucleótidos en las uniones entre los segmentos. Este proceso de la recombinación V(D)J permite una predicción matemática de diversidad de unas $10^{15} - 10^{20}$ moléculas diferentes de TCR. Sin embargo, muchos TCRs generados por azar no serán funcionales. Entre todos los timocitos que se generan, el timo selecciona positivamente una fracción de células T funcionales que son capaces de reconocer los péptidos antigénicos presentados por MHC. Además de la selección anterior, mediante la selección negativa, se eliminan aquellos timocitos potencialmente autorreactivos capaces de reconocer péptidos derivados de antígenos propios. Por lo tanto, con dichas selecciones positiva y negativa hay una estimación de $\sim 10^8$ moléculas de TCR (Havel et al., 2019; Schrama et al., 2017).

Cada cadena de TCR contiene tres regiones determinantes de complementariedad (CDR; del inglés, *complementarity-determining regions*): CDR1, CDR2 y CDR3 (Figura 17). Los CDR1 y CDR2 están codificados por el gen V, mientras que CDR3 se codifica por la unión de los segmentos V(D)J y presenta mayor variabilidad (Six et al., 2013). Las regiones CDR1 y CDR2 reconocen e interactúan con la molécula de MHC, mientras que el CDR3 interacciona con el péptido antigénico unido a la molécula de MHC (J. Lu et al., 2019). Cuando una célula T se activa, todas las células expandidas clonalmente expresan el mismo CDR3 (Turner et al., 2006). Dado que las células T $\alpha\beta$ son las más abundantes en el sistema circulante y debido a que la cadena β de TCR está más diversificada por la presencia de un segmento extra de diversidad (D), la secuenciación de la región CDR3 del TCR- β permite una mejor caracterización del repertorio de células T (Aversa et al., 2020).

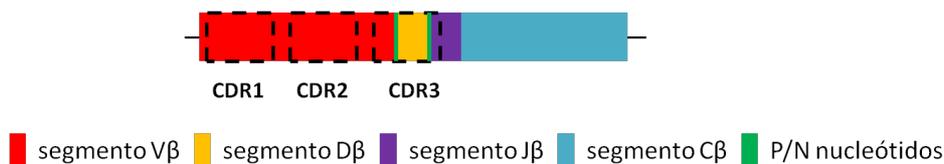


Figura 17. Regiones de mayor variabilidad del TCR-β: CDR1, CDR2 y CDR3.

7.3. REPERTORIO TCR: ROL COMO BIOMARCADOR.

Como hemos explicado en los apartados anteriores, entre los posibles nuevos biomarcadores vinculados a los tratamientos de inmunoterapia, el análisis del perfil del repertorio de células T puede tener una gran relevancia ya que está estrechamente relacionado con la carga de neoantígenos (Figura 18).

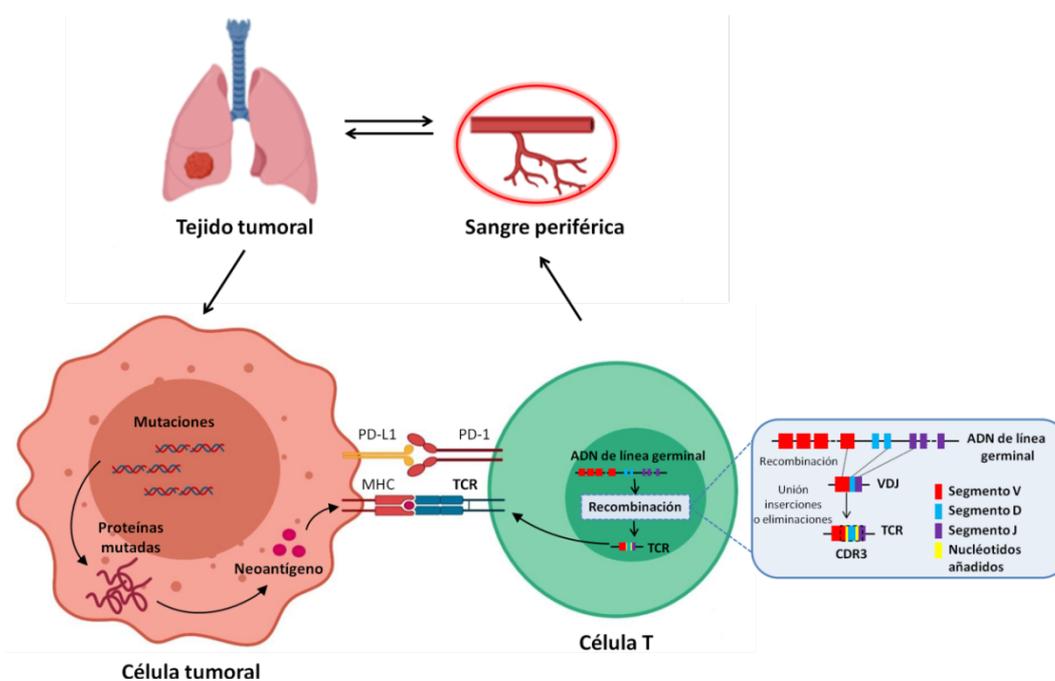


Figura 18. Linfocitos T y reconocimiento de neoantígenos tumorales.

Las células tumorales debido a su inestabilidad son capaces de producir proteínas alteradas, algunas de las cuales pueden ser un neoantígenos. Los neoantígenos se procesan dentro de la célula tumoral, y son presentados por la molécula del MHC y reconocidos por un TCR de células T específicas de neoantígenos. El TCR localizado en la superficie de las células T es un heterodímero que en el dominio variable cuenta con tres regiones de mayor variabilidad denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDRs). La región CDR3 está codificada a nivel génico en los segmentos V, D y J. Durante la recombinación somática, uno de cada segmento se combina aleatoriamente y se introduce una mayor diversidad mediante inserciones y/o eliminaciones de nucleótidos añadidos. El CDR3 es la principal región responsable de reconocer los antígenos procesados. Tras la activación de células T específicas de neoantígenos, estas células se expanden clonalmente y pueden circular entre el tumor y la circulación sistémica. PD-1: proteína 1 de muerte celular programada; PD-L1: ligando 1 de muerte programada; MHC: molécula de complejo mayor de histocompatibilidad; TCR: receptor de células T.

INTRODUCCIÓN

Durante muchos años, el estudio del repertorio de TCR estaba limitado debido a la falta de tecnologías fiables y robustas (Faint et al., 1999; Nobrega et al., 1993). En los últimos años, el desarrollo de la tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS; del inglés, *next generation sequencing*) ha facilitado la caracterización del repertorio TCR en un análisis (Robins, 2013) que puede resumirse en tres pasos: amplificación por PCR de segmentos de genes VDJ (para TCR- β) o VJ (para TCR- α); secuenciación masiva paralelamente de los amplicones generados; y alineación de las lecturas de NGS mediante herramientas bioinformáticas (Schrama et al., 2017).

Hasta la fecha, el estudio del impacto de los patrones de TCR en la inmunoterapia en el CPNM se ha centrado en el análisis del repertorio TCR- β intratumoral. La mayor clonalidad de TCR- β previo al tratamiento y su aumento durante la terapia en el TME han demostrado estar relacionada con la respuesta a ICBs, posicionando al análisis del repertorio TCR como un posible nuevo biomarcador para predecir la respuesta a inmunoterapia (Anagnostou et al., 2019; Forde et al., 2018; Wang et al., 2019; Zhang et al., 2020).

Sin embargo, al analizar el repertorio de TCR en el tejido tumoral, debe tenerse en cuenta la heterogeneidad intratumoral. Dicha heterogeneidad se ha observado al analizar la clonalidad de los TILs CD4 + y CD8 + en diferentes regiones del mismo tumor, resultando en una composición diferente de clones dependiendo de la región analizada, lo que refleja la diversidad espacial y temporal de los neoantígenos generados durante la evolución del cáncer de pulmón (de Bruin et al., 2014; Reuben et al., 2017; Zhang et al., 2019).

Un hecho importante que debe comentarse en cáncer de pulmón, relativa a la disponibilidad de muestras tumorales para su análisis es el alto porcentaje de pacientes en los que sus muestras tumorales se consumen por completo durante los procedimientos de diagnóstico, lo que limita las posibilidades de un análisis más completo de las características moleculares de las células tumorales y de la composición de su TME. Si a estos le sumamos la necesidad de monitorizar de forma dinámica el comportamiento de los tumores frente al tratamiento administrado, lo que requeriría la realización de rebiopsias secuenciales, es extremadamente difícil abordar una estrategia de precisión en este tipo de pacientes.

con CPNM avanzado. Una herramienta alternativa para dar respuesta a estas situaciones planteadas en la clínica la encontramos en la biopsia líquida, basada en el uso de muestras mínimamente invasivas, como la sangre periférica y que se puede explorar como fuente para analizar poblaciones de células T relacionadas con la respuesta antitumoral (Hofman et al., 2019). Hay evidencia que los clones de las células T expandidos en respuesta a neoantígenos tumorales pueden moverse entre el tumor y la circulación periférica (Yost et al., 2019). Además, estudios previos han demostrado que la expansión periférica de los clones de TCR- β dominantes residentes en el tumor durante la terapia con ICBs está asociada con una mejor respuesta y SLP (Anagnostou et al., 2019; Zhang et al., 2020). No obstante, hasta la fecha, las conclusiones sobre el valor pronóstico o predictivo del análisis del repertorio periférico de TCR- β en pacientes tratados con ICBs son inconsistentes y, en ocasiones, contradictorias. Por ejemplo, tanto una alta como una baja diversidad en el repertorio de TCR en sangre se han reportado asociadas con un mejor pronóstico (Cha et al., 2014; Han et al., 2020; Looney et al., 2020; Robert et al., 2014). Las inconsistencias de los resultados pueden deberse al hecho que se analizan cohortes pequeñas, con diferentes tipos de tumores, con distintos tipos de ICBs y la carencia de una metodología estándar para analizar e interpretar los resultados de la secuenciación de TCR- β . En consecuencia, hay una necesidad no cubierta de estudios más precisos sobre el valor del análisis del repertorio TCR como biomarcador pronóstico y/o predictivo de respuesta a la terapia con ICBs lo que justifica los objetivos planteados en esta tesis doctoral.

II. OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este estudio persigue, a través de técnicas de NGS, caracterizar en profundidad el repertorio de TCRs en sangre periférica en una cohorte de pacientes diagnosticados con CPNM en estadios avanzados tratados en primera línea con bloqueantes del eje PD-1/PD-L1, y analizar su posible uso como biomarcadores predictivos y/o pronósticos mediante una aproximación mínimamente invasiva.

Objetivos específicos:

1. Diseñar y optimizar una metodología basada en NGS para evaluar y analizar el repertorio de TCR- β en sangre periférica.
2. Comparar las características del repertorio de TCR- β en sangre periférica entre los pacientes con CPNM y controles sanos.
3. Analizar indicadores que miden la diversidad y similitud del repertorio TCR en las muestras basales y a la primera evaluación de respuesta de la cohorte de pacientes incluidos en el presente estudio.
4. Correlacionar las características generales del repertorio de TCR- β con variables clínico-patológicas y pronósticas en las diferentes muestras analizadas (pretratamiento y a la primera evaluación de respuesta).
5. Relacionar la presencia y dinámica de los clonotipos de células T en muestras sanguíneas basales y primera evaluación de respuesta con la respuesta a bloqueantes de PD-1 y variables pronósticas.
6. Integrar los resultados obtenidos sobre la contribución de diferentes poblaciones de células T en la respuesta a ICB en CPNM y determinar su posible utilidad como biomarcadores.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. PACIENTES Y CONTROLES

1.1. PACIENTES Y VARIABLES CLÍNICAS

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, y sigue los principios de la Declaración de Helsinki (Ver Anexo 1). Todos los pacientes fueron informados acerca de la realización de este estudio y firmaron un consentimiento autorizando el uso de las muestras que les fueron extraídas con fines de investigación (Ver Anexo 2). Los sujetos con enfermedad autoinmune previa o concurrente o SIDA fueron excluidos del estudio.

Entre enero de 2019 y septiembre de 2020, se incluyeron en el presente estudio un total de 33 pacientes con confirmación histológica de CPNM en estadios avanzados (según 8ª edición del sistema de estadificación de la IASLC) (Detterbeck et al., 2017). Los pacientes recibieron tratamiento estándar en primera línea con: i) pembrolizumab (200 mg cada 21 días; $n=24$) o ii) combinación de pembrolizumab con quimioterapia (pembrolizumab 200 mg, cisplatino 130 mg, pemetrexed 200 mg, cada 21 días; $n=9$).

Los datos demográficos (fecha de nacimiento, sexo, hábito tabáquico, etc.) y clínico-patológicos (diagnóstico histopatológico, estadio, estado funcional, presencia de metástasis y sus localizaciones, tamaño del tumor, respuesta al tratamiento, fecha de progresión o exitus) de los pacientes se obtuvieron de las historias clínicas y fueron anonimizados de acuerdo a la normativa vigente.

La tasa de respuesta objetiva (ORR; del inglés, *objective response rate*) se evaluó utilizando los criterios de *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors version 1.1* (RECIST 1.1) (Eisenhauer et al., 2009) clasificándose en: respuesta completa (RC), respuesta parcial (RP), enfermedad estable (EE) y progresión de enfermedad (PE). La respuesta objetiva se utilizó para clasificar los pacientes en: i) beneficio clínico duradero (BCD) definida como RC, RP o EE durante más de 6 meses y ii) no BCD, que agrupa a aquellos pacientes con PE dentro

MATERIALES Y MÉTODOS

de los 6 meses posteriores al inicio del tratamiento.

Las variables pronósticas de supervivencia se estimaron a partir de la fecha del inicio de tratamiento hasta la fecha de PE (según *RECIST 1.1*), o de exitus para la SLP y la SG, respectivamente. La fecha considerada para los cálculos en los casos no censurados fue la fecha del último seguimiento registrado del paciente.

1.2. CONTROLES

El grupo control consistió en 7 voluntarios sanos anónimos, que aceptaron donar sus muestras para investigación, firmando el correspondiente consentimiento. Las muestras de sangre periférica del grupo control fueron tomadas en el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

2. MUESTRAS BIOLÓGICAS

2.1. SANGRE PERIFÉRICA

En todos los casos ($n= 33$) se obtuvieron muestras de sangre periférica basales (PRE), previo al inicio del tratamiento de inmunoterapia. Al momento de la primera evaluación de la respuesta (1E; aproximadamente tres meses después del inicio de tratamiento) se obtuvo una nueva muestra en 19 de los pacientes incluidos en el estudio. Como se mencionó en el apartado anterior, también se recogieron muestras de sangre periférica en individuos controles sanos ($n= 7$).

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron mediante venopunción por personal cualificado. En todos los casos, se recogió sangre venosa en 2 tubos de 10 ml con el anticoagulante EDTA (*BD Vacutainer®*). Estos tubos fueron recogidos y procesados en el laboratorio dentro de las 3 horas siguientes a la recolección de las muestras.

2.2. CÉLULAS MONONUCLEARES

Las muestras sanguíneas fueron procesadas para la obtención de las células mononucleares (PBMCs; del inglés, *peripheral blood mononuclear cells*) a temperatura ambiente. Se utilizó una centrifugación en gradiente de densidad con el fin de aislar los componentes sanguíneos.

En primer lugar, se realizó una centrifugación de 20 minutos a 120 g para separar la fracción de plasma rica en plaquetas que se conservó para otros estudios. Se añadió 1,5 ml de tampón fosfato salino (PBS; del inglés, *phosphate buffered saline*) en el tubo remanente (conteniendo la fracción celular de leucocitos y eritrocitos), y se homogeneizó mediante inversión. Se prepararon dos tubos cónicos de 15 ml y se le añadió 4 ml de *Ficoll-Paque PLUS™* (GE Healthcare Health Sciences) a cada uno. Se agregó la dilución sanguínea en PBS hasta 5 ml cuidando de no afectar la interfase de *Ficoll*. A continuación, se centrifugó a 400 g durante 30 minutos sin freno con el fin de aislar las PBMCs (Figura 19).

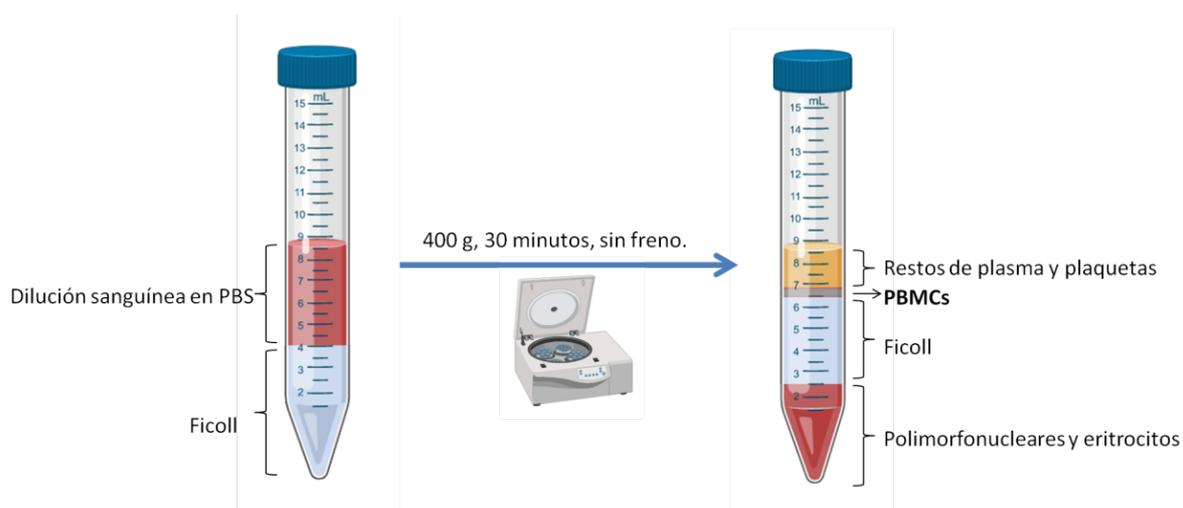


Figura 19. Obtención de las PBMCs mediante gradiente de densidad en *Ficoll*.

Representación esquemática de las capas de componentes sanguíneos obtenidas mediante la centrifugación. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) utilizadas en el estudio se muestran en negrita.

La interfase de PBMCs se recogió y se lavó dos veces con PBS seguida de centrifugación a 400 g durante 5 minutos. Después de descartar el sobrenadante, se resuspendió el pellet de PBMCs con *RNAlater®* para estabilizar el RNA, pasándose todo el volumen a un microtubo

de 1,5 ml y preservándose a -80°C hasta el momento de su utilización.

2.3. RNA

2.3.1. EXTRACCIÓN DE RNA

La extracción de RNA total de las PBMCs se realizó mediante el kit comercial *MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation (Thermo Fisher Scientific)*, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Brevemente, i) en primer lugar se lisaron las PBMCs (aproximadamente 10^6 células) con isopropanol y 2-mercaptoetanol, ii) se incubó el lisado con unas *beads* o bolas magnéticas que unen al RNA, iii) se realizó un lavado con solución de lavado I (con isopropanol añadido) y dos lavados sucesivos con la de lavado II (con etanol añadido) para eliminar proteínas, detergentes y otras impurezas, iv) tratamiento con *DNase™* y por último, v) elución de RNA se llevó a cabo mediante el tampón de elución provisto en el kit. El RNA total aislado se cuantificó y almacenó a -80°C hasta su posterior análisis.

2.3.2. CUANTIFICACIÓN DE RNA

La cuantificación del RNA extraído se realizó mediante el kit *Qubit™ RNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific)* en el fluorómetro *Qubit (Qubit™ 3.0 Fluorometer, Thermo Fisher Scientific)*. Para ello, se preparó el master mix de la *Working Solution* con 1 µl de *Qubit™ Reagent* y 199 µl de *Qubit™ Buffer* para cada reacción, que permite la fluorescencia de la muestra siempre que esta se adhiera a la molécula. Para la calibración del equipo se añadió 190 µl de la *Working Solution* en un microtubo, y se le agregó 10 µl de *Standard I*. Para el *Standard II* se repitió el mismo proceso. Se dieron las lecturas a los *Standard I* y *II* para establecer los rangos de lectura dentro de la curva para la cuantificación de las muestras. Tras la calibración, se añadieron 198 µl de la *Working Solution* y 2 µl de RNA para cada muestra. Cada muestra fue leída determinando la cuantificación de las mismas en ng/µl. Este kit de alta sensibilidad permite medir concentraciones en un rango de 250 pg/µl – 100 ng/µl. La precisión de las mediciones incluso a bajas concentraciones hace que el

fluorómetro *Qubit* sea la herramienta ideal para aplicaciones posteriores de NGS.

2.3.3. EVALUACIÓN DE CALIDAD DE RNA

Las muestras de RNA se sometieron a una valoración de su integridad utilizando el kit *Agilent™ RNA 6000 Pico (Agilent Technologies)* en el bioanalizador *Agilent™ 2100 (Agilent Technologies)*. A través de la tecnología de microfluidos, y de electroforesis capilar se realiza una separación de la muestra por tamaño de los fragmentos de RNA, realizándose luego una detección por fluorescencia. Según el tamaño de los fragmentos observados en el electroferograma, el software del instrumento calcula el número de integridad del RNA (RIN; del inglés, *RNA Integrity number*), un parámetro numérico que indica la calidad del RNA (Figura 20). Los valores de RIN se expresan entre 1 y 10, (siendo 1 el valor de una muestra extensamente degradada y 10 el valor de máxima integridad del RNA) (Schroeder et al., 2006). Aquellas muestras que obtuvieron un RIN igual o mayor que 7 se consideraron óptimas para someterse a la posterior secuenciación.

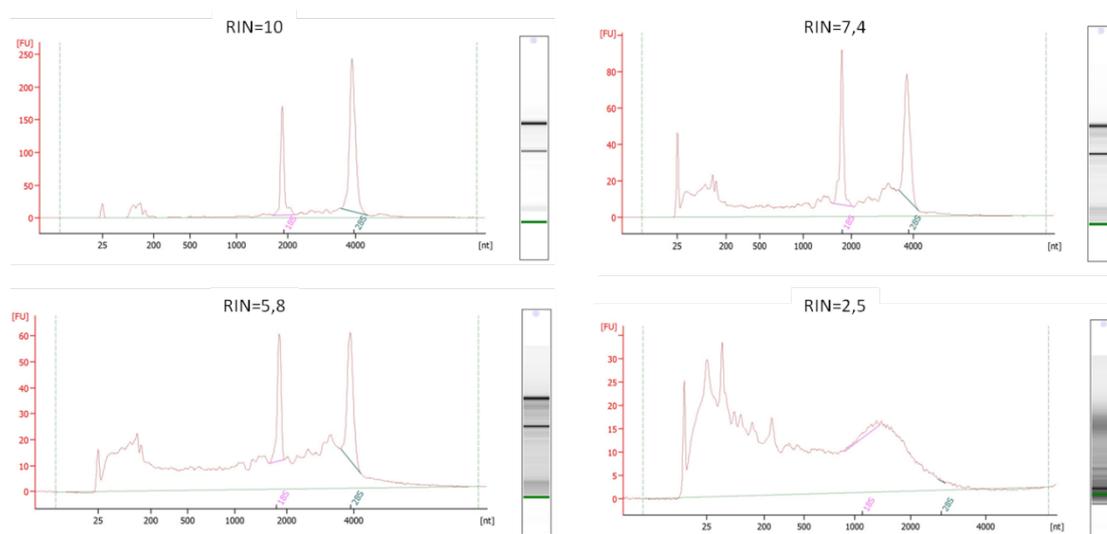


Figura 20. Electroferograma de muestras de RNA con diferentes RIN.

En la imagen superior izquierda se muestra un perfil de una muestra de RNA con integridad máxima, mientras que en la imagen de la derecha inferior se puede observar un RNA con alta degradación donde desaparecen los picos correspondientes al RNA 18S y 28S. RIN: número de integridad del RNA.

2.3.4. REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN

La reacción de retrotranscripción (RT) para la síntesis del DNA complementario (cDNA; del inglés, *complementary DNA*) se realizó a partir de 25 ng del RNA aislado a partir de PBMCs para un volumen final de reacción de 10 μ l, mediante el kit *SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis (Invitrogen™)*, tal y como se muestra en la Tabla 1. La reacción de RT se realizó según las condiciones detalladas en la Tabla 2 en un termociclador *Veriti Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific)*. Una vez terminada la RT, el cDNA se almacenó a -20°C hasta su utilización.

Tabla 1. Componentes para la RT.

Componente	Volumen (μ l)
5x VILO Reaction Mix	2
10x SS Enzyme Mix	1
RNA total (25ng)	≤ 7
Agua libre de nucleasas	hasta 10
Total	10

Tabla 2. Condiciones de tiempo y temperatura para la RT.

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
25	10
50	10
85	5
10	∞

2.4. DNA

2.4.1. EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción de DNA se realizó mediante el kit *MagMAX™ DNA Multi-Sample Ultra 2.0 (Thermo Fisher Scientific)*, siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, i) para empezar se lisaron las PBMCs (aproximadamente 10^6 células) con proteinasa K, ii) se incubó el lisado con unas *beads* o bolas magnéticas que unen al DNA, iii) se realizó un lavado con

solución de lavado y a continuación dos lavados más con etanol 80%, v) elución de DNA en tampón de elución provisto en el kit. El DNA aislado se cuantificó y almacenó a -20°C hasta su posterior análisis.

2.4.2. CUANTIFICACIÓN DE DNA

La cuantificación de DNA extraído se llevó a cabo mediante el uso del kit *QubitTM DNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific)* en el fluorómetro *Qubit (QubitTM 3.0 Fluorometer, Thermo Fisher Scientific)*, con una alta sensibilidad para ser preciso a concentraciones de $10\text{ pg}/\mu\text{l}$ – $100\text{ ng}/\mu\text{l}$. La cuantificación de DNA sigue los mismos procedimientos explicados para la cuantificación de RNA. Las concentraciones de DNA se expresaron en $\text{ng}/\mu\text{l}$.

3. SECUENCIACIÓN DE TCR- β

La preparación de librerías para la secuenciación de la región CDR3 del TCR- β se realizó mediante el kit *OncomineTM TCR Beta-SR (Thermo Fisher Scientific)* a partir de cDNA o DNA aislado según se muestra en la Figura 21.

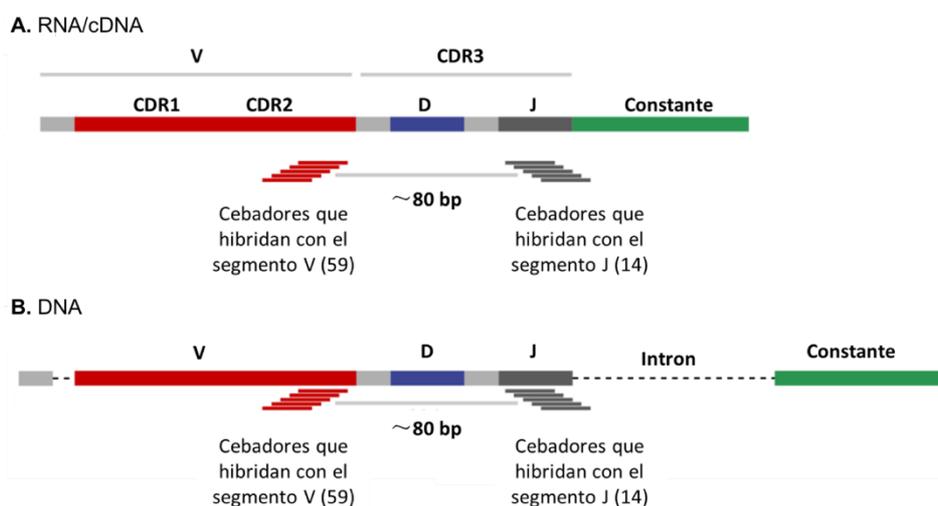


Figura 21. Amplificación de la región CDR3 del TCR- β . Adaptado y traducido de *Oncomine Human Immune Repertoire User Guide (Thermo Fisher Scientific)*.

El kit *OncomineTM TCR Beta-SR* utiliza 59 cebadores que hibridan con el segmento V y los 14 con el segmento J para la obtención de amplicones de ~ 80 pares de bases (bp), a partir de RNA/cDNA (A) o DNA (B).

3.1. AMPLIFICACIÓN DE REGIÓN CDR3 DE TCR- β

En este paso de amplificación del CDR3 del TCR- β , cuando el material de partida fue cDNA, se preparó una solución de 20 μ l de volumen final con la siguiente composición: 10 μ l de cDNA (25 ng) y 10 μ l de mezcla de reacción según se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Componentes de la reacción de PCR de amplificación de cDNA.

Componente	Volumen (μ l)
cDNA (25 ng)	10
<i>5X Ion Ampliseq™ HiFi Mix</i>	4
<i>5X Oncomine™ TCR Beta-SR Panel</i>	4
Agua libre de nucleasas	2
Volumen total	20

Las condiciones de amplificación se detallan en la Tabla 4 y se llevaron a cabo en un termociclador *Veriti Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific)*.

Tabla 4. Programa de ciclado para la amplificación de cDNA.

Ciclos	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1 ciclo	Activación de DNA polimerasa	95	2 minutos
20 ciclos	Desnaturalización	95	30 segundos
	<i>Anneling</i>	60	45 segundos
	Extensión	72	45 segundos
1 ciclo	Extensión final	72	10 minutos
Espera	—	10	∞

Cuando el material de partida fue DNA, la preparación de la mezcla para la amplificación se realizó según se muestra en la Tabla 5.

Posteriormente se realizó la amplificación del DNA según el programa de ciclado que se indica en la Tabla 6 en el termociclador *Veriti Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific)*.

Una vez terminada la reacción de amplificación, se siguió con la de digestión parcial de amplicones.

Tabla 5. Componentes de la reacción de PCR de amplificación de DNA.

Componente	Volumen (μ l)
DNA (200 ng)	x (10 μ l como máximo)
<i>5X Ion Ampliseq™ HiFi Mix</i>	4
<i>5X Oncomine™ TCR Beta-SR Panel</i>	4
<i>dNTP Mix (7,5 mM)</i>	2
Agua libre de nucleasas	10-x
Volumen total	20

Tabla 6. Programa de ciclado para la amplificación de DNA.

Ciclos	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1 ciclo	Activación de DNA polimerasa	95	2 minutos
28 ciclos	Desnaturalización	95	30 segundos
	<i>Anneling</i>	60	45 segundos
	Extensión	72	45 segundos
1 ciclo	Extensión final	72	10 minutos
Espera	—	10	∞

3.2. DIGESTIÓN PARCIAL DE LOS AMPLICONES

La digestión parcial de los amplicones se realizó mediante 2 μ l de *FuPa* para cada reacción (Figura 22). El reactivo de *FuPa* contiene una enzima de escisión o modificación de uracilos, una DNA polimerasa con actividad exonucleasa 3' \rightarrow 5', un anticuerpo que inhibe las actividades de la DNA polimerasa y un tampón de almacenamiento.

Las condiciones de la PCR para la digestión parcial se muestran en la Tabla 7. Seguidamente se procedió a la ligadura de adaptadores a amplicones mediante el *Ion Torrent™ Dual Barcode adapter*.

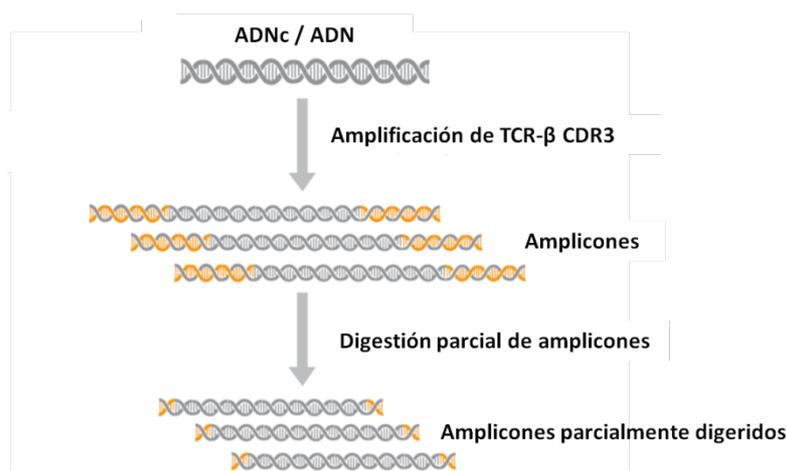


Figura 22. Amplificación de TCR-β CDR3 y digestión parcial de los amplicones. Adaptado y traducido de *OncoPrint Human Immune Repertoire User Guide (Thermo Fisher Scientific)*.

Tabla 7. Programa de ciclado para la digestión de amplicones.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
50	10
55	10
60	20
10	∞ (hasta una hora)

3.3. LIGACIÓN DE ADAPTADORES A AMPLICONES

Tras la digestión parcial de los amplicones, se eliminaron los cebadores en exceso y se prepararon los extremos de los amplicones para la ligación con los adaptadores, código de barras y adaptador P1, mediante el uso de la enzima *DNA ligase*. El código de barras consiste en una determinada secuencia de DNA específica y única con el fin de identificar cada muestra y de esta manera, poder secuenciar varias muestras en una misma carrera. El adaptador P1 permite la fijación del amplicón a una superficie sólida y es el mismo para todas las librerías (Figura 23).

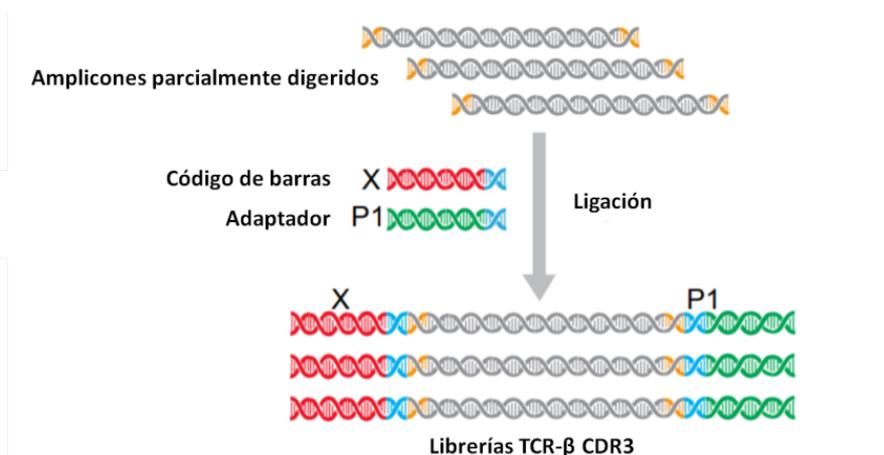


Figura 23. Ligación de adaptadores a amplicones. Adaptado y traducido de *OncoPrint Human Immune Repertoire User Guide (Thermo Fisher Scientific)*.

El código de barras X (específico para cada muestra) y el adaptador P1 (común a todas las muestras) se unen a cada extremo de los amplicones parcialmente digeridos mediante la acción de *DNA ligase*.

Para la reacción de ligación se agregaron los siguientes componentes en el orden indicado en la Tabla 8. Posteriormente se ejecutó el programa que se indica en la Tabla 9.

Tabla 8. Componentes de la ligación de adaptadores a amplicones.

Orden de adición	Componente	Volumen (μl)
1	<i>Switch Solution</i>	4
2	<i>Ion Torrent™ Dual Barcode Kit 1-96 adapters</i>	2
3	<i>DNA Ligase</i>	2
	Volumen total	30

Tabla 9. Programa de ciclado para la ligación de adaptadores a amplicones.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
22	30
68	5
72	5
10	∞ (hasta una hora)

Una vez terminado el programa, se prosiguió al paso de purificación o bien la placa se almacenó a -20°C para continuar posteriormente.

3.4. PURIFICACIÓN Y ELUCIÓN DE LIBRERÍA

La purificación de las librerías se llevó a cabo mediante el agregado a la mezcla obtenida en el paso anterior de 45 μ l de *beads* magnéticas *Agencourt™ AMPure™ XP Reagent (Beckman Coulter)*. Los fragmentos de DNA mayores o iguales a 100 bp se unen selectivamente a estas *beads*. Seguidamente se pasó esta mezcla por un imán *DynaMag™-96 Side Magnet (Thermo Fisher Scientific)* que retiene las *beads* con el DNA unido a las mismas, mientras que se desechó el sobrenadante. Posteriormente se lavó el pellet dos veces con 150 μ l de etanol al 70%, para eliminar el exceso de cebadores, nucleótidos, enzimas y sales. Se mantuvo la placa en el imán secando las partículas magnéticas al aire a temperatura ambiente durante 5 minutos. Seguidamente, las librerías purificadas unidas a las *beads* se eluyeron con 50 μ l de una solución tampón baja en sales (tampón *Low TE (Thermo Fisher Scientific)*). Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se colocó nuevamente la mezcla en el imán de manera que las *beads* quedan retenidas y las librerías se recuperan en el eluido para su posterior cuantificación.

3.5. CUANTIFICACIÓN DE LIBRERÍAS DE TCR- β

La cuantificación de las librerías se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), usando *Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific)* que utiliza sondas *TaqMan®* para obtener una medida cuantitativa de los productos de amplificación (Figura 24).

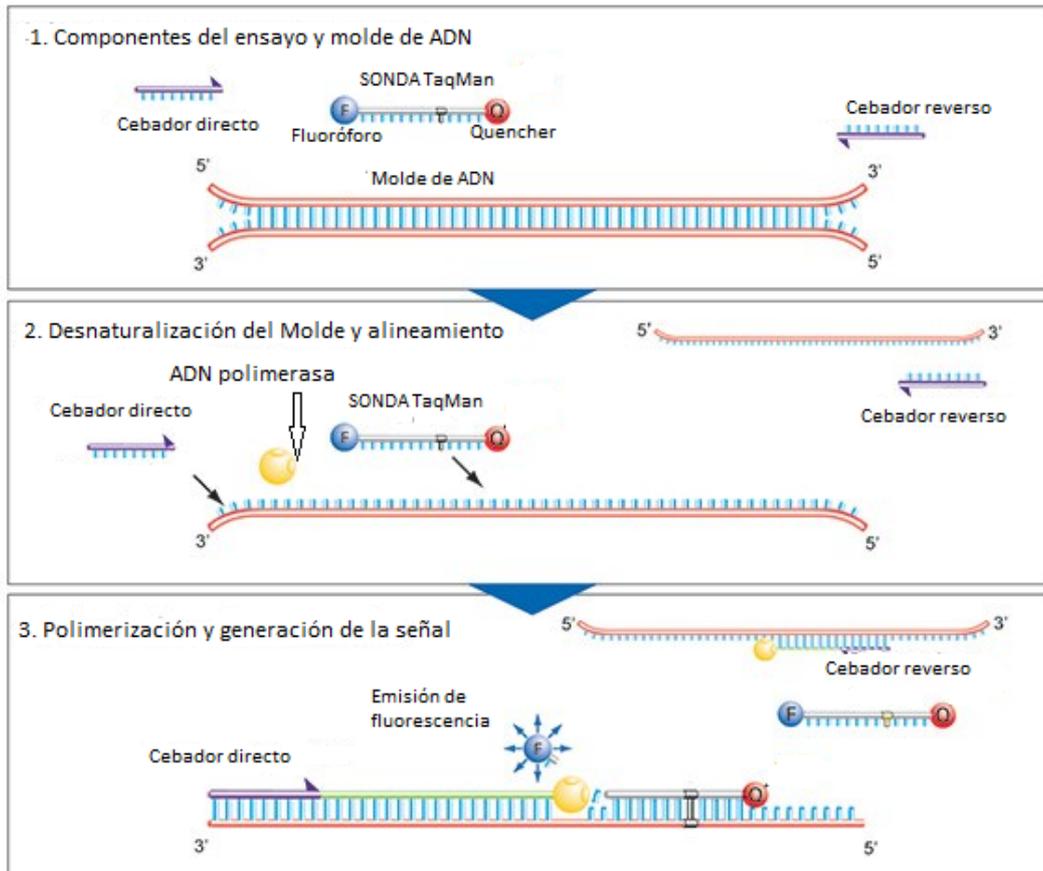


Figura 24. Pasos de reacción de qPCR con sondas *TaqMan*[®]. Adaptado y traducido de *Ion Library TaqMan Quantitation Kit User Guide (Thermo Fisher Scientific)*.

La sonda *TaqMan*[®] de oligonucleótidos está formada por un fluoróforo en el extremo 5' y un desactivador de fluorescencia (*quencher*) en el extremo 3'. En el caso de que el *quencher* y el fluoróforo estén próximos el uno al otro, no se emite fluorescencia por la actividad inhibitoria del *quencher*. En cambio, tras la hibridación con la secuencia que va a ser amplificada, se hidroliza por la acción de la exonucleasa 5'-3' de la DNA polimerasa *Taq* que va extendiendo la cadena, rompiendo la proximidad con el *quencher* y permitiendo la emisión de la fluorescencia. La señal de fluorescencia detectada es directamente proporcional al número de amplicones producidos en cada ciclo de la PCR.

Con la finalidad de determinar las concentraciones de las librerías preparadas, un control de librerías de *E. coli DH10B*, provisto en el kit, se utilizó y se diluyó en serie para generar un conjunto de estándares. Las librerías preparadas se diluyeron 1:100 para que se encuentren dentro del rango de los estándares preparados. Cada reacción fue analizada por duplicado en una placa de 384 pocillos en el equipo *LightCycler 480 II (Roche)* de acuerdo a las condiciones que se detallan en la Tabla 10. La concentración de cada librería se obtuvo mediante la interpolación de los CT (del inglés, *cycle threshold*), en la curva de patrones

(Figura 25).

Tabla 10. Condiciones de la qPCR.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
Pre-PCR (incubación)	50	2 minutos
Pre-PCR (activación de DNA polimerasa)	95	20 segundos
PCR (40 ciclos)	95	1 segundo
	60	20 segundos

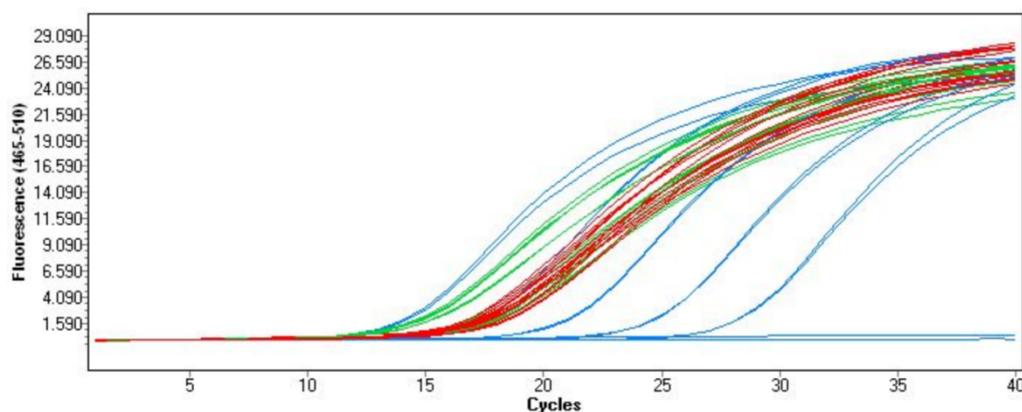


Figura 25. Ejemplo de gráfico de amplificación de PCR.

En el presente ejemplo, se prepararon por duplicado las diluciones de librerías preparadas (en rojo y verde), el control negativo (H_2O) y las diluciones del control *E.Coli DH10B* de concentración conocida (en azul).

Aquellas muestras con una desviación entre dos réplicas superior a un 5% en base logarítmica fueron analizadas de nuevo.

3.6. COMBINACIÓN DE LIBRERÍAS

Todas las librerías fueron normalizadas a 25 pM y, de cada una, se cogieron 10 μ l para realizar una mezcla o *pool* por cada experimento en un microtubo de 1,5 ml. La combinación de las librerías se utilizó para continuar con el siguiente paso, o bien dicha mezcla se almacenó a 4°C hasta un máximo de un mes desde su preparación.

3.7. PREPARACIÓN DEL TEMPLADO

Previamente a la secuenciación, 25 μ l de la combinación de las librerías normalizadas a

25 pM se amplificó clonalmente mediante una PCR en emulsión usando el *Ion 510™ & Ion 520™ & Ion 530™ Kit–Chef* (Thermo Fisher Scientific) en el instrumento de *Ion Chef™* (Thermo Fisher Scientific), permitiendo cargar dos chips en aproximadamente 13 horas. La Figura 26 ilustra el instrumento *Ion Chef™*.

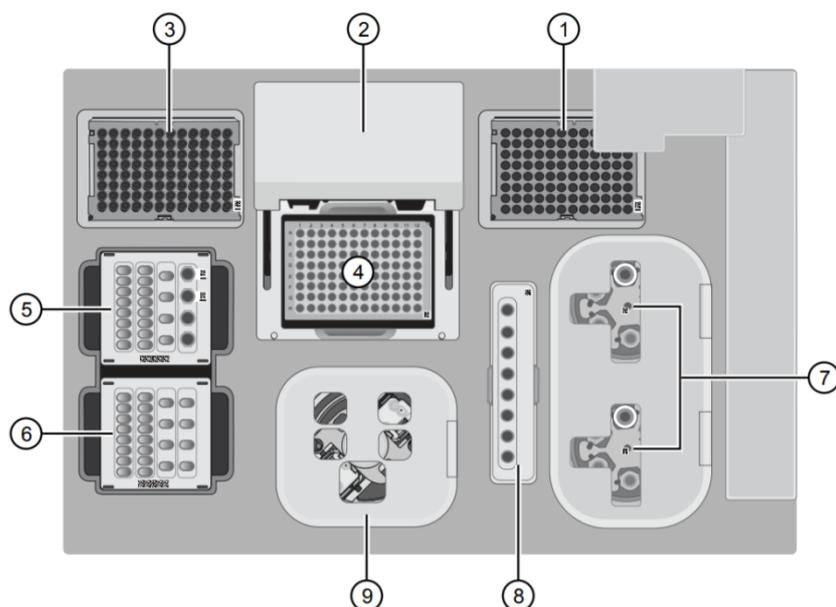


Figura 26. El instrumento *Ion Chef™* utilizado para la preparación del templado previo a la secuenciación. Adaptado y traducido de *Ion 510™ & Ion 520™ & Ion 530™ Kit–Chef User Guide* (Thermo Fisher Scientific).

① Gradilla para puntas de pipeta de desecho; ② Cubierta calentada automatizada: durante el ciclo térmico, la cubierta calentada aplica compresión para sellar la placa de reacción y calienta la cubierta para evitar la condensación; ③ Gradilla para nuevas puntas de pipeta; ④ Termociclador: realiza el ciclo térmico de las muestras en una placa de reacción de PCR de 96 pocillos; ⑤ Estación de las librerías diluidas, NaOH y el cartucho de reactivos *Ion 510™ & Ion 520™ & Ion 530™ Chef*; ⑥ Estación del cartucho *Ion S5™ Chef Solutions*; ⑦ Centrifugas: dos centrifugas realizan la centrifugación de las partículas esféricas (ISP; del inglés, *Ion Sphere™ Particles*) durante la preparación del templado; ⑧ Estación de los consumibles para el enriquecimiento de las ISP amplificadas; ⑨ Centrifuga de carga de chips: realiza la centrifugación de chips de secuenciación que se han cargado con ISP.

En este proceso se generan gotas micelares, cada una de las cuales contiene los siguientes componentes: una partícula esférica denominada como *Ion Sphere™ Particles* (ISP), una secuencia de DNA de librería y los reactivos necesarios para PCR. Las ISP son partículas esféricas con una superficie recubierta con cebadores que hibridan con los adaptadores P1 de las librerías y se amplifican mediante PCR. De esta forma, se producen amplificaciones de las librerías sobre las ISP (Figura 27). Antes de la carga del chip, se realiza

un enriquecimiento de ISP amplificadas monoclonales (copias idénticas de librerías) y policlonales (más de una copia de librería diferentes), descartando las ISP “vacías” (sin amplificación en su superficie). Posteriormente las ISP se dispersan en el chip que contiene millones de micropocillos, de manera que cada ISP se encuentre en uno de los pocillos (Goodwin et al., 2016; Merriman et al., 2012; Rothberg et al., 2011).

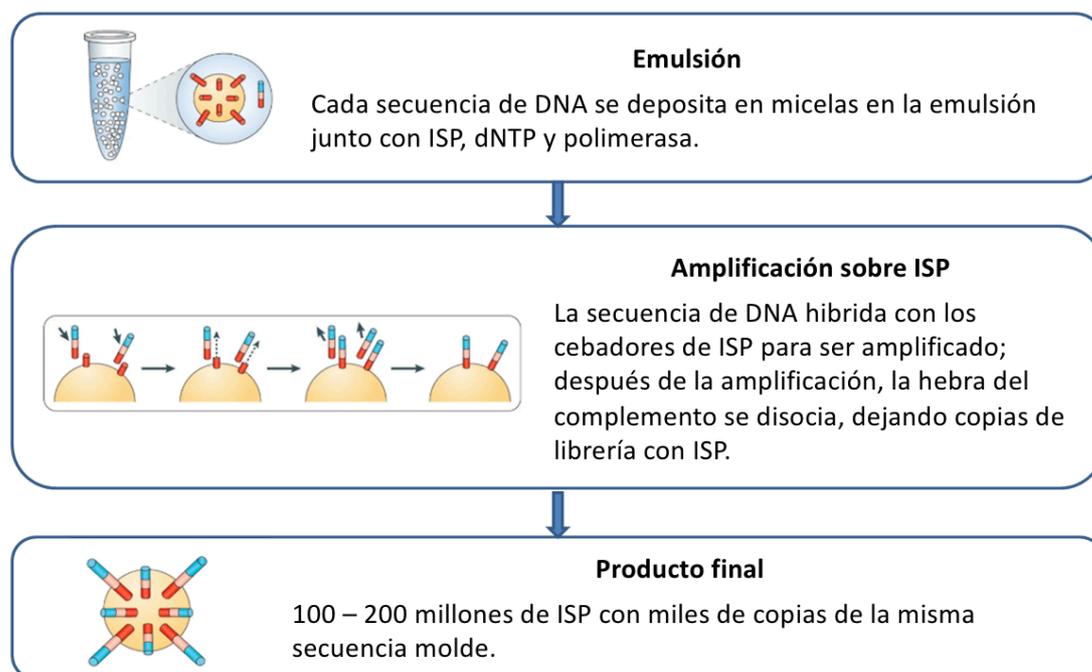


Figura 27. Esquema de PCR de emulsión. Adaptado y traducido de Goodwin et al., 2016.

Las ISP presentan en su superficie cebadores (rojo) que hibridan con el adaptador P1 de las librerías. Tras la amplificación clonal se obtiene el producto final, copias de librerías idénticas sobre las ISP.

Una concentración muy baja de librería de entrada puede condicionar un número insuficiente de ISP para secuenciar; mientras que una alta concentración puede resultar en mayor cantidad de ISP policlonales, o sea, mayor obtención de ISP con más de una molécula de DNA. Por lo tanto, una concentración óptima de librería de entrada es necesaria para obtener un buen rendimiento de ISP monoclonales en este proceso.

3.8. SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN

La secuenciación de TCR- β CDR3 se realizó en el equipo *Ion GeneStudio™ S5 Series*

System de Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific) con una configuración de 850 flujos totales, basando en una secuenciación por síntesis que se explicará a continuación.

El principio de la secuenciación en *Ion Torrent* se basa en los cambios de pH causados por la liberación de iones de hidrógeno (H^+) durante la polimerización del DNA (Figura 28). Cada vez que la enzima polimerasa incorpora un nucleótido complementario a la cadena de DNA, se liberan un H^+ y pirofosfato como subproductos, lo que hace que cambie el pH de la solución. Los cambios en el pH se pueden detectar mediante un sensor de iones ubicado en el fondo de cada pocillo del chip. La liberación de H^+ da como resultado un cambio de 0,02 unidades en el pH. Esos cambios de pH se convierten en señales de voltaje. Se realizan lavados entre cada flujo con el fin de eliminar los remanentes de nucleótidos no incorporados y se agrega el siguiente de manera que sólo un nucleótido puede ser responsable de la señal (Goodwin et al., 2016; Pereira et al., 2020). Una vez completada la secuenciación, el instrumento realiza el **procesamiento de la señal** cruda por flujo. Cuando se incorpora un nucleótido, la señal es 1; y si la secuencia tiene homopolímeros, la señal es mayor que 1. En cambio, cuando no se incorporan nucleótidos, la señal es cero.

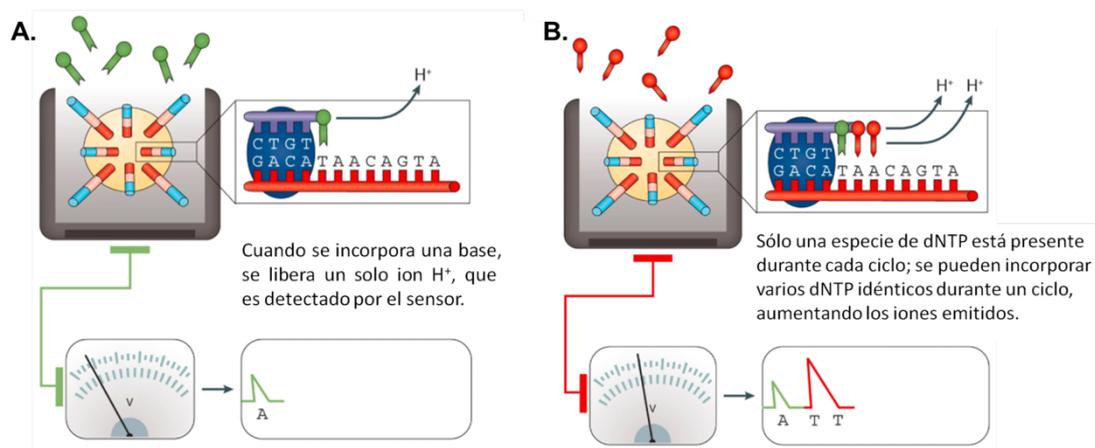


Figura 28. Secuenciación por síntesis. Adaptado y traducido de Goodwin et al., 2016.

A. Un nucleótido complementario de la cadena molde se incorpora y se libera un ion H^+ , que es detectado por un sensor en el fondo. B. Dos nucleótidos idénticos se incorporan en un ciclo, liberando dos iones H^+ que son registrados por el sensor.

Una vez terminada la secuenciación y el procesamiento de la señal, la obtención de las lecturas de secuencias de DNA se llevó a cabo mediante la ayuda del *software*

MATERIALES Y MÉTODOS

bioinformático *Torrent Suite™* (Thermo Fisher Scientific). Las lecturas llevan asociados un valor del nivel de calidad *Phred* (*Phred score*, en inglés). Este parámetro se define como: $Q = -\log P$, donde Q es el nivel de calidad *Phred*, y P es las probabilidades de error de cada base asignada (*base calling*). Esta medida se utiliza ampliamente para caracterizar la calidad de las secuencias de DNA y es un parámetro para comparar diferentes métodos de secuenciación.

El **filtrado de las lecturas** se realizó tras el recorte de las secuencias adaptadoras, tal y como se muestra a continuación:

- Policlonalidad: las lecturas con múltiples señales, es decir, las ISP que se combinaron más de una molécula de DNA durante el PCR de emulsión (con copias de dos o más moléculas), se filtran y se descartan.
- Baja calidad: las lecturas con señal no reconocible o de baja calidad de señal se filtran y se descartan.
- Dímero de cebadores: las lecturas con secuencias de longitud <25 bp se consideran como dímeros de cebadores, se filtran y se descartan.

Tras la filtración se obtuvo la proporción de lecturas totales útiles, dividiendo las lecturas totales que pasan los filtros por la cantidad de ISP con secuencias de librerías.

Para el presente estudio, se utilizó el chip *Ion 530™* (Thermo Fisher Scientific) que contiene aproximadamente 37 millones de pocillos y permite secuenciar 8 librerías de TCR- β , consiguiendo entre 15 – 20 millones de lecturas finales. Cuando la secuenciación es eficaz, requiere aproximadamente 1,2 – 1,6 millones de lecturas por librería.

3.9. EVALUACIÓN DE CALIDAD DE SECUENCIACIÓN

Con el fin de evaluar la calidad de cada carrera de secuenciación, el análisis bioinformático del *Torrent Suite™ Software* (Thermo Fisher Scientific) reporta diferentes

métricas de calidad para la secuenciación del repertorio inmune. Los valores óptimos de dichas variables se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11. Métricas para evaluar la calidad de la secuenciación.

Métricas	Valores recomendados
Carga ISP	90%
Enriquecimiento de ISP con librerías	90 – 100%
Policlonalidad	30 – 40%
Lecturas de baja calidad	12%
Dímero de cebadores	8%
Lecturas totales útiles	15 – 20 millones
Proporción de lecturas totales útiles	50 – 60%
Longitud media de lecturas	80 bp

Adaptado y traducido de *OncoPrint Human Immune Repertoire User Guide* (Thermo Fisher Scientific).

Luego, las lecturas totales útiles se alinean con secuencias de referencia de la base de datos IMGT® (*International ImMunoGeneTics information system*®) para obtener los reordenamientos VDJ de cada secuencia (<http://www.imgt.org/>).

3.10. PROCESAMIENTO DE LAS SECUENCIAS

Las lecturas obtenidas se clasificaron tales como se muestra en la Tabla 12, considerando tanto la eliminación de lecturas mapeadas fuera de diana o de baja calidad como la corrección de errores de secuenciación indel y los errores de PCR.

Para tener un buen rendimiento de lecturas, las lecturas productivas deben ser más del 30 – 50% con un incremento a más de 50 – 70% considerando las lecturas rescatadas.

Tabla 12. Clasificación de lecturas.

Clasificación de lecturas	Descripción
Lecturas productivas	Lecturas que presentan segmentos V y J, sin codón de parada.
Lecturas productivas rescatadas	Lecturas que presentan segmentos V y J, sin codón de parada, después de la corrección de errores de secuenciación de tipo indel.
Lecturas no productivas	Lecturas que presentan secuencias no rescatables o errores de PCR, no mapean en segmentos V y J, o tienen codón de parada prematuro.
Lecturas fuera de diana/baja calidad	Lecturas que representan un producto de amplificación fuera de la diana o lecturas de baja calidad.

Adaptado y traducido de *OncoPrint Human Immune Repertoire User Guide* (Thermo Fisher Scientific).

4. CARACTERIZACIÓN DEL REPERTORIO DE TCR- β

Una misma secuencia VDJ identificada por secuenciación corresponde a un clonotipo de células T, o sea tiene un CDR3 idéntico en la cadena β y surge por la expansión de una célula T luego de activarse tras reconocer a su antígeno. Un clonotipo se define como la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 del TCR- β (CDR3- β AA), la secuencia de nucleótidos (CDR3- β NT) y la identificación de los segmentos V, D y J que lo componen, cada uno de los cuales se informa: i) con el número de lecturas identificadas en el proceso de secuenciación y ii) la frecuencia en base al número de lecturas totales reportadas para cada muestra.

Con el fin de caracterizar el repertorio de TCR- β de cada muestra, se evaluaron los siguientes índices mediante el programa informático *Ion Reporter™ software* (Thermo Fisher Scientific):

(1) **Riqueza:** cantidad de clonotipos diferentes encontrados en una muestra (Robert et al., 2014). Se estima en base al número de secuencias CDR3- β NT diferentes presentes. Una

limitación del uso de este índice es que no tiene en cuenta la frecuencia de cada secuencia. Es decir, dos muestras pueden presentar el mismo valor de riqueza, pero diferente distribución.

(2) **Equidad**: medición de la similitud del tamaño de diferentes clones, también conocida como la diversidad normalizada. Se calcula como:

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

donde p_i representa la frecuencia de un clonotipo i y R representa riqueza. Por lo tanto, este índice tiene en cuenta no sólo la riqueza del repertorio, sino también la distribución del tamaño clonal (frecuencia). Los valores de equidad varían de 0 a 1. Las muestras donde todos los clonotipos son de igual frecuencia tendrán una equidad de 1, mientras que las muestras que tienen clones de tamaños desiguales tendrán una equidad <1 . La clonalidad es determinada como: $1 - \text{equidad}$; cuanto menor el índice de equidad, mayor será la clonalidad (Pielou, 1966).

(3) **Convergencia**: consiste en la sumatoria de frecuencia de los clonotipos convergentes definidos como los que presentan una secuencia CDR3- β AA idéntica con la presencia del mismo segmento V, pero difieren en el nivel de secuencias CDR3- β NT (Looney et al., 2020).

El cambio de cada índice entre las muestras basales y la primera evaluación de respuesta se definió como el logaritmo del ratio 1E/PRE en base 10 ($\log_{10}(1E/PRE)$), donde el valor mayor que 0 representa un aumento del índice entre las muestras pretratamiento y la primera evaluación.

El **índice de Jaccard** se utilizó para estudiar la similitud de las secuencias CDR3- β NT que conforman el repertorio entre las muestras sanguíneas basales y la primera evaluación de respuesta del mismo sujeto. La formulación del índice de Jaccard es la siguiente:

$$\frac{c}{(a+b-c)},$$

donde a es el número de secuencias presentes en pretratamiento, b es el número de secuencias presentes en el momento de la primera evaluación, y c es el número de

secuencias compartidas entre dos puntos de tiempo (secuencias presentes tanto en pretratamiento como en primera evaluación de respuesta). En este sentido, 0 significa que las muestras basales y la primera evaluación de respuesta no presentan secuencias compartidas; y el valor tiende a 1 a medida que aumenta el número de secuencias CDR3- β NT compartidas (Rempala & Seweryn, 2013).

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS

Para el análisis de todas las variables del estudio, en primer lugar se determinó si seguían o no una distribución normal. Como la mayoría de ellas no la tenían, se utilizó en todos los casos estadística no paramétrica. Las comparaciones entre dos grupos independientes se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney y la prueba exacta de Fisher para variables continuas y dicotómicas, respectivamente. Además, se utilizó la prueba de Wilcoxon, para estudiar si existían diferencias significativas en un conjunto de muestras pareadas (por ejemplo, DNA vs. RNA, y PRE vs. 1E). La correlación entre dos variables continuas se evaluó mediante el coeficiente de correlación de Spearman. El análisis de componentes principales (PCA; del inglés, *principal component analysis*) y la prueba de ANOSIM se realizaron para representar gráficamente similitudes entre las unidades y correlaciones entre las variables. El diagrama de Sankey se utilizó para visualizar la presencia y frecuencia de los reordenamientos V-J más abundantes en las muestras analizadas.

Tal y como se mencionó previamente, las variables pronósticas de supervivencias se estimaron a partir de la fecha del inicio de tratamiento hasta la fecha de a PE o exitus para la SLP y la SG, respectivamente. La fecha considerada para los cálculos en los casos no censurados fue la fecha del último seguimiento registrado del paciente. La tasa de riesgo (HR; del inglés, *hazard ratio*) y el intervalo de confianza del 95% (95%CI) se estimaron mediante el método de regresión de Cox univariante. El método de Kaplan-Meier se utilizó para calcular las tasas de supervivencias (SLP y SG) y el estadístico de contraste log-rango se empleó para

evaluar las diferencias entre los grupos. Para ello, las variables continuas se transformaron en variables dicotómicas.

Las gráficas para presentar algunos de los resultados se realizaron mediante el programa *Graphpad Prism version 9.0*.

Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 24.0* y *R version 3.5*. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES

Las características demográficas y clínico-patológicas de los pacientes del estudio, incluidas edad, sexo, estadio de enfermedad, histología, entre otras se resumen en la Tabla 13. La edad mediana de los pacientes fue de 65 años y la mayoría de ellos eran hombres (72,7%) y fumadores (75,8%). La decisión sobre el tipo de tratamiento que recibieron los pacientes se tomó de acuerdo a la práctica clínica habitual. En 24 pacientes, los niveles de expresión en tejido tumoral de PD-L1 (medido como TPS, *tumor proportion score*) fueron $\geq 50\%$, lo que permitió seleccionar a estos pacientes para recibir tratamiento con pembrolizumab en monoterapia, mientras que en 9 pacientes con expresión de PD-L1 $< 1\%$ ($n= 6$) o entre 1 – 49% ($n= 3$) fueron tratados con pembrolizumab en combinación con quimioterapia. La ORR fue del 36,4% (12/33). Las variables demográficas y clínico-patológicas de los pacientes con mayor detalle se encuentran en las Tablas S3 y S4, respectivamente.

Tabla 13. Características demográficas y clínico-patológicas de los pacientes del estudio.

Características demográficas	n = 33	%
Edad (años) (mediana, rango)	65 [45 – 87]	
Sexo		
Hombre	24	72,7
Mujer	9	27,3
Hábito tabáquico		
Fumador	25	75,8
Exfumador	6	18,2
Nunca fumador	2	6,1
Características clínico-patológicas	n = 33	%
Histología		
Adenocarcinoma	24	72,7
Epidermoide	4	12,1
Células grandes	1	3,0
Pobremente diferenciado	4	12,1
Estadio		
IIIA ¹	2	6,1
IIIB	3	9,1
IIIC	1	3,0
IVA	16	48,5
IVB	11	33,3
Tamaño de tumor ²		
≤5 cm	19	57,6
>5 cm	14	42,4
Nº. localizaciones metastásicas ²		
≤2	20	60,6
>2	13	39,4
PD-L1 TPS ³		
<1%	6	18,2
1 – 49%	3	9,1
≥50%	24	72,7
Tratamiento en primera-línea		
Pembrolizumab monoterapia	24	72,2
Pembrolizumab-Cisplatino-Pemetrexed	9	27,3
Respuesta RECIST a los 6 meses		
Respuesta parcial	12	36,4
Enfermedad estable	10	30,3
Progresión de enfermedad	11	33,3

¹. IIIA: pacientes no candidatos a cirugía, radiación o quimioterapia. ². Tamaño de tumor y número de localizaciones metastásicas dicotomizados según las medianas. ³. La expresión de PD-L1 se evaluó mediante proporción de puntuación en tumores (TPS, *tumor proportion score*) y se informó como: TPS <1%, TPS 1 – 49% y TPS ≥50%.

2. ANÁLISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS DE LA SECUENCIACIÓN

2.1. SECUENCIACIÓN DE TCR- β A PARTIR DE DNA

2.1.1. CUANTIFICACIÓN DEL DNA

En 12 muestras de PBMCs de 6 pacientes del estudio (PRE y 1E emparejada de los pacientes P3, P5, P8, P10, P15 y P17) se aisló DNA para su posterior secuenciación. La cuantificación de las muestras extraídas arrojó una concentración óptima en todos los casos con una mediana de concentración de 27 ng/ μ l [rango: 3,54 – 48,7 ng/ μ l].

2.1.2. DATOS DE LA SECUENCIACIÓN DE TCR- β A PARTIR DE DNA

Los datos de secuenciación TCR- β de las 12 librerías obtenidos a partir de DNA dieron como resultado una mediana de 1.216.109 [rango: 820.205 – 1.620.712] lecturas productivas totales por muestra, con una longitud media de 80 bp. La proporción de lecturas productivas y rescatadas se encontró entre 55% y 72%, como se muestra en la Figura 29, indicando que la secuenciación del CDR3 del TCR- β a partir de DNA de las muestras fue satisfactoria, con lo que se podía continuar con los análisis posteriores.

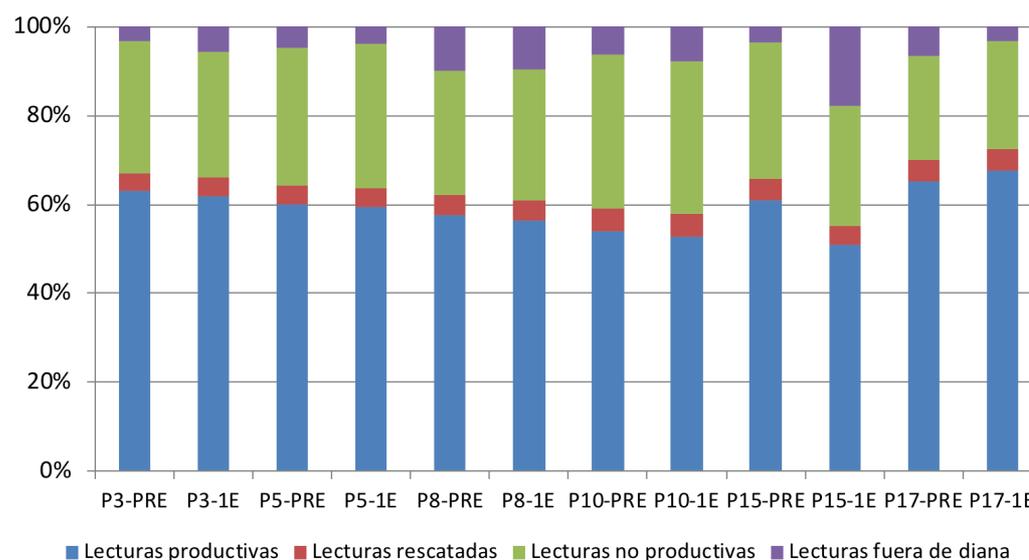


Figura 29. Distribución de lecturas obtenidas por librerías de CDR3 TCR- β a partir de DNA.

Cada barra representa las lecturas de una librería. Cada color corresponde a un tipo de lectura. P: paciente; PRE: pretratamiento; 1E: primera evaluación de respuesta.

2.2. SECUENCIACIÓN DE TCR- β A PARTIR DE RNA

2.2.1. CUANTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE INTEGRIDAD DEL RNA

El RNA aislado a partir de un total de 59 muestras de PBMCs, incluyendo 33 muestras sanguíneas basales y 19 muestras obtenidas en la primera evaluación de respuesta de los pacientes, así como 7 muestras de controles se cuantificó, obteniéndose concentraciones entre 18,2 y 126 ng/ μ l, con una mediana de 76,5 ng/ μ l. En cuanto a su integridad evaluada mediante el bioanalizador *Agilent 2100*, la mediana de RIN fue de 9,3 [rango: 7 – 10] (Figura 30), indicando que la totalidad de las muestras presentaba una buena calidad y se consideraron aptas para la preparación de las librerías. Estos datos indican que el aislamiento de PBMCs con la ayuda de *Ficoll* y *RNAlater* es satisfactoria para conservar la integridad del RNA.

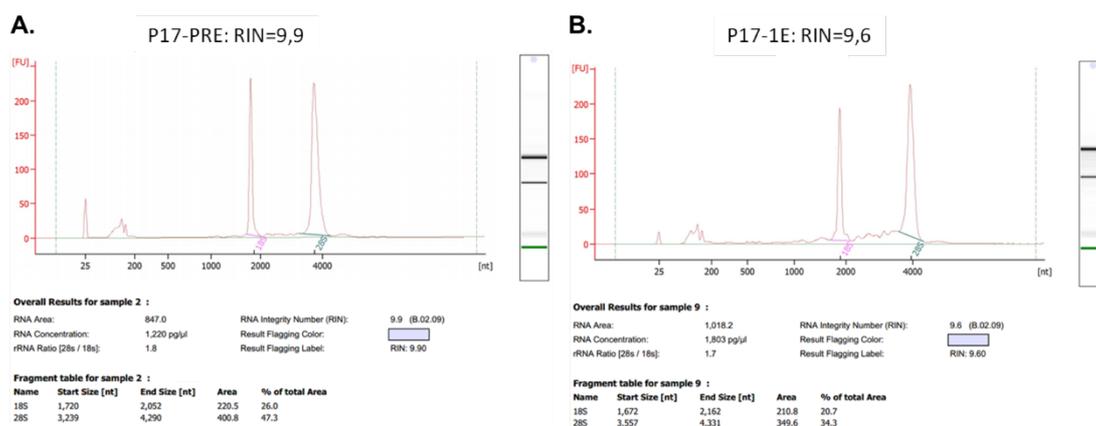


Figura 30. Ejemplos de perfiles electroforéticos en el bioanalizador *Agilent 2100* de las muestras de RNA. A. Muestra P17-PRE, RIN= 9,9. B. Muestra P17-1E, RIN= 9,6. P: paciente; PRE: pretratamiento; 1E: primera evaluación de respuesta.

2.2.2. DATOS DE LA SECUENCIACIÓN DE TCR- β A PARTIR DE RNA

Se obtuvieron un total de 59 librerías de TCR- β . Los datos de secuenciación de TCR- β CDR3 dieron como resultado una mediana de 1.556.304 [rango: 552.776 – 2.427.120] lecturas productivas totales por muestra, con una longitud media de 86 bp. Una proporción de 50% o más de lecturas productivas y rescatadas se observó en todas las muestras (Figura 31).

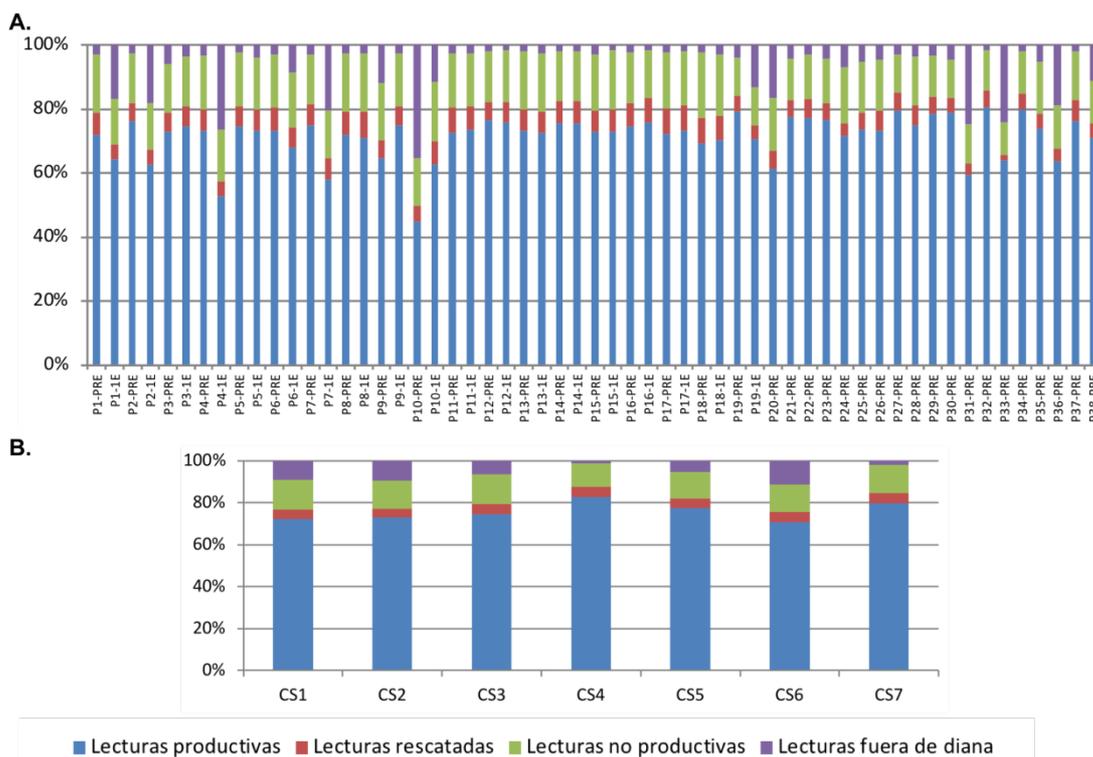


Figura 31. Distribución de lecturas obtenidas por librerías de CDR3 TCR-β a partir de RNA. A. Librerías pretratamiento (PRE) y de la primera evaluación de respuesta (1E) de los pacientes (P). B. Librerías de controles sanos (CS). Cada barra representa las lecturas de una librería. Cada color corresponde a un tipo de lectura.

Se observa que la librería P10-PRE presentó la menor proporción de lecturas productivas (color azul), que puede relacionar con la menor integridad de la molécula de RNA con el valor de RIN más bajo (RIN = 7). Después de sumar las lecturas rescatadas, tenía la proporción de lecturas productivas totales del 50%, sugiriendo que la secuenciación fue apta para continuar con el análisis posterior. Estos resultados indican que la aproximación de la secuenciación de TCR-β a partir de RNA es adecuada para analizar el TCR en sangre periférica y además permite correr 8 muestras en un mismo chip *Ion 530™*, así minimizando el tiempo y el coste de esta metodología.

3. ANÁLISIS DEL REPERTORIO TCR: COMPARACIÓN ENTRE SECUENCIACIÓN DE RNA Y DNA

La NGS o la secuenciación masiva de alto rendimiento es una herramienta imprescindible para el análisis del repertorio TCR que permite conocer características importantes, como la clonalidad o la composición de segmentos VDJ (Aversa et al., 2020). Sin embargo, a día de hoy aún no existe un método estándar para realizar esta determinación. Una de las decisiones más importantes para iniciar el análisis de la diversidad del TCR radica en la selección del material de partida para la secuenciación, es decir, si es mejor utilizar DNA o RNA.

El DNA es el material de partida utilizado en muchos estudios publicados para caracterizar el repertorio de TCR. El DNA es muy estable y contiene un número fijo de copias por célula, lo que permite una cuantificación ajustada de los clones de TCR. Sin embargo, el uso de DNA no proporciona ninguna información sobre el nivel de expresión de las secuencias de TCR y puede dar lugar a errores en los resultados de secuenciación debido a intrones, posibles residuos de recombinación V(D)J y sitios de cebado que interfieren en la muestra (De Simone et al., 2018).

El empleo de RNA puede superar las principales limitaciones asociadas con el uso de DNA, y permite una identificación más completa de clones de TCRs únicos con mayor sensibilidad (Wu et al., 2019).

En este estudio, con la finalidad de establecer una aproximación óptima para la caracterización del repertorio de células T se realizó, como primer paso, una comparación de los resultados de secuenciación de TCR a partir de RNA y DNA en 12 muestras pareadas (PRE y 1E de P3, P5, P8, P10, P15 y P17).

3.1. RIQUEZA, EQUIDAD Y CONVERGENCIA DEL REPERTORIO TCR- β A PARTIR DE RNA Y DE DNA

Basando en las secuencias productivas y rescatadas obtenidas de las librerías, se obtuvo la información de varios índices para cada muestra, incluyendo riqueza, equidad y convergencia de TCR. Los valores de los índices obtenidos de las secuenciaciones a partir de RNA y DNA se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Índices de riqueza, equidad y convergencia del repertorio TCR- β obtenidos a partir de secuenciación de RNA y DNA.

Muestra	Riqueza		Equidad		Convergencia	
	RNA	DNA	RNA	DNA	RNA	DNA
P3-PRE	28652	4226	0,7396	0,8220	0,014	0,006
P3-1E	27542	3887	0,8288	0,7286	0,009	0,007
P5-PRE	33284	6622	0,7956	0,8819	0,012	0,004
P5-1E	37288	6510	0,8359	0,8593	0,009	0,004
P8-PRE	24246	1260	0,6993	0,8808	0,219	0,240
P8-1E	30786	3373	0,8244	0,7638	0,073	0,094
P10-PRE	26728	5186	0,8539	0,8330	0,008	0,002
P10-1E	34875	7146	0,8144	0,8649	0,005	0,002
P15-PRE	25723	7437	0,9429	0,9507	0,003	0,004
P15-1E	69067	5425	0,9213	0,9437	0,010	0,001
P17-PRE	38381	1258	0,8555	0,8720	0,019	0,018
P17-1E	58561	4754	0,8117	0,8179	0,010	0,003

P: paciente; PRE: pretratamiento; 1E: primera evaluación de respuesta; RNA: datos obtenidos a partir de secuenciación de RNA; DNA: datos obtenidos a partir de secuenciación de DNA.

Se realizó el análisis comparativo entre los índices calculados desde ambas aproximaciones mediante la prueba de Wilcoxon (Figura 32). En cuanto a la riqueza, se detectaron mucho más clonotipos mediante la secuenciación de RNA en comparación con la de DNA ($p= 0,002$; Figura 32 A). Esta observación se debe a que cada célula T tiene una sola copia del gen de la cadena β del TCR a nivel genómico, mientras que existen múltiples copias del transcrito que codifica para esta cadena a nivel de RNA. Al comparar el índice de equidad y la convergencia entre las aproximaciones, los valores no mostraron diferencias

estadísticamente significativas ($p= 0,209$ y $p= 0,239$, respectivamente; Figura 32 B, C) ya que se trata de valores normalizados.

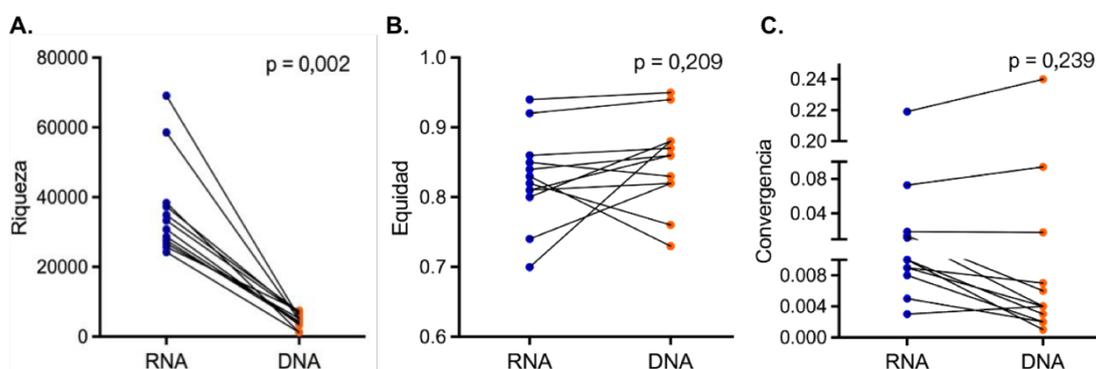


Figura 32. Análisis comparativo de los índices de riqueza (A), equidad (B) y convergencia (C) del repertorio de TCR-β de acuerdo de las metodologías de secuenciación basada en DNA y RNA. P valores obtenidos en la prueba de Wilcoxon. Cada punto representa a una muestra, el color azul representa los datos obtenidos de RNA y el color naranja representa los datos obtenidos de DNA.

3.2. CLONOTIPOS DETECTADOS ENTRE SECUENCIACIÓN A PARTIR DE RNA Y DNA

A continuación, se evaluó la diferencia de la distribución de clonotipos entre ambas aproximaciones. Las secuencias CDR3 nucleotídicas de cada librería se clasificaron según su frecuencia como <0,01%, 0,01% – 0,1%, 0,1% – 1% y >1%. Se calculó la frecuencia sumada de los clonotipos de cada uno de los cuatro grupos en relación con el repertorio total (Figura 33).

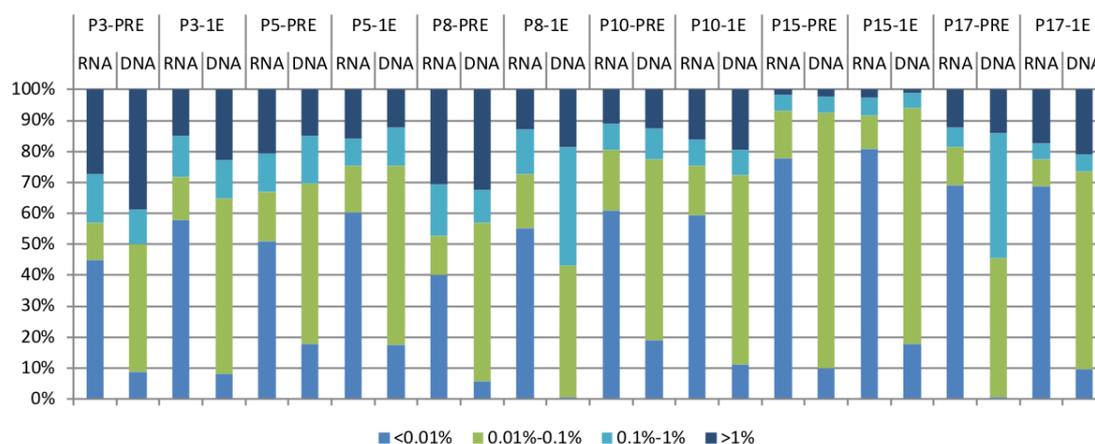


Figura 33. Distribución de los clonotipos CDR3 NT según porcentaje de representación. Cada barra representa las secuencias CDR3 NT de una determinada muestra. Cada color corresponde a un grupo de

clonotipos. Por cada muestra, dos barras que muestran los resultados obtenidos de la secuenciación de RNA (izquierda) y de DNA (derecha). P: paciente; PRE: pretratamiento; 1E: primera evaluación de respuesta; RNA: datos obtenidos a partir de secuenciación de RNA; DNA: datos obtenidos a partir de secuenciación de DNA; NT: secuencia nucleotídica.

Las frecuencias sumadas de los clonotipos de grupos encontrados con mayor frecuencia 0,1% – 1% y >1% fueron similares entre los datos obtenidos de secuenciación de RNA y DNA ($p= 0,583$ y $p= 0,117$, respectivamente). Esto indica que los clonotipos más abundantes detectados mediante una aproximación (RNA o DNA), pudieron ser detectados también con la otra aproximación, aunque con diferente frecuencia, lo que dio como resultado inconsistente cuando se calcularon las frecuencias relativas de clonotipos (Figura 34).

Por otra parte, el porcentaje de clonotipos con frecuencia entre 0,01% – 0,1% se encontró más alto en los datos obtenidos de la secuenciación de DNA que RNA ($p= 0,002$); en cambio, los clonotipos menos frecuentes (del grupo <0,01%) presentaron una sumatoria de frecuencias más alta en los datos obtenidos de la secuenciación de RNA en comparación con la secuenciación de DNA ($p= 0,002$). Como se muestra en la Figura 34, la secuenciación de RNA de TCR permite una identificación más sensible de clonotipos CDR3, lo que incluiría a aquellos que están presentes en una proporción muy pequeña de células, información que se pierde cuando el análisis se realiza a partir de DNA.

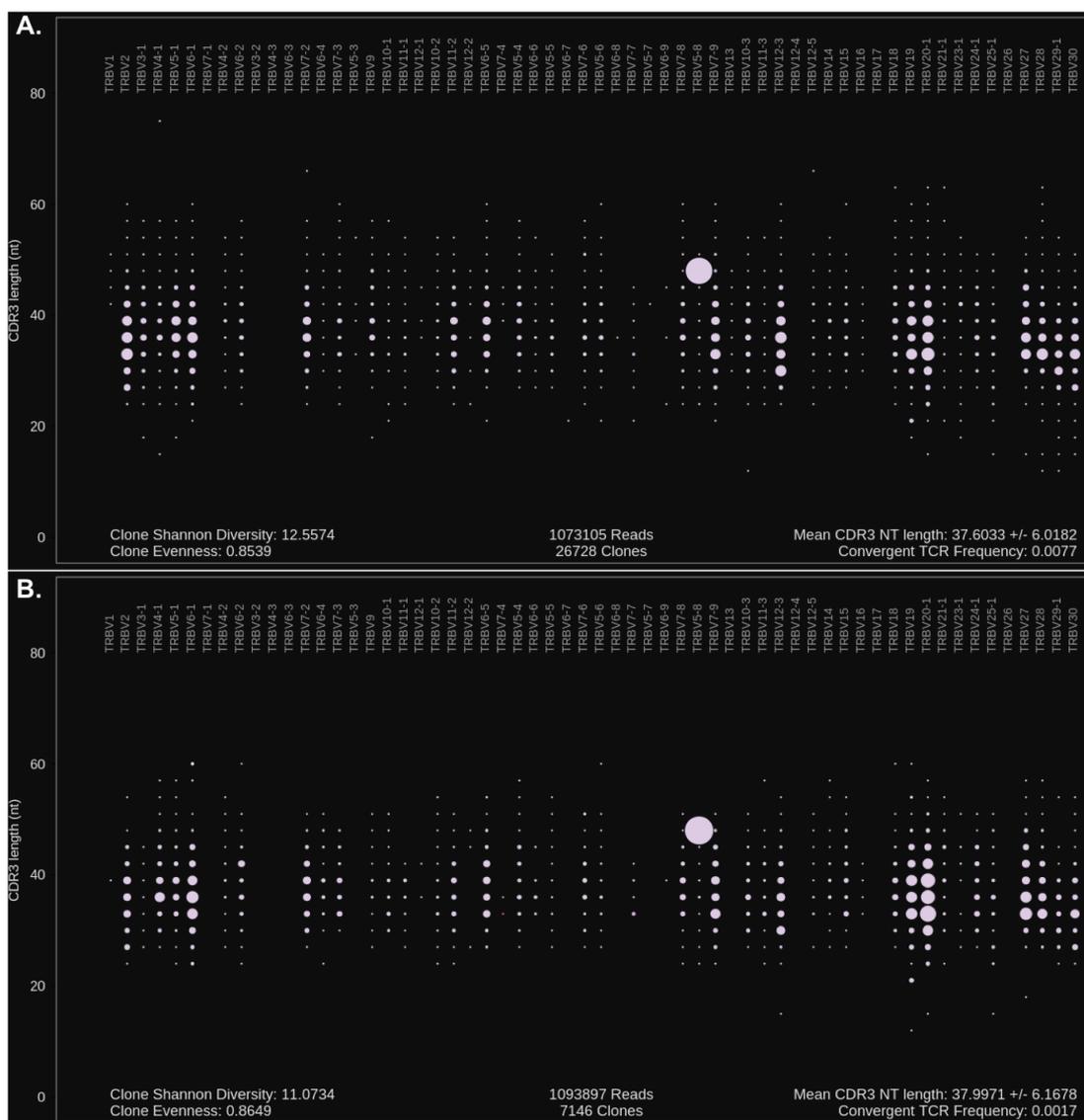


Figura 34. Ejemplo representativo de la comparación de los clonotipos para muestra P10-PRE. A. Datos obtenidos de la secuenciación basada en RNA. B. Datos obtenidos de la secuenciación basada en DNA. Los círculos representan los clonotipos que tienen un mismo segmento V en particular con la misma longitud de nucleótidos, y el tamaño del círculo indica la frecuencia de dichos clonotipos (análisis obtenido mediante el *software Ion Reporter*).

En conjunto, podemos concluir que los ensayos *Oncomine TCR-Beta SR*, tanto a partir de RNA como de DNA, son capaces de caracterizar el repertorio de TCR-β. Sin embargo, el empleo de RNA puede identificar un perfil más completo de clonotipos incluidos los que se encuentran en frecuencias muy bajas.

Por lo tanto, en el presente estudio, la caracterización del repertorio de TCR en sangre periférica tanto de pacientes como de controles sanos se llevó a cabo mediante la secuenciación de RNA, utilizando el kit *Oncomine TCR-Beta SR (RNA)*.

4. DIFERENCIAS DEL REPERTORIO TCR- β EN SANGRE PERIFÉRICA ENTRE PACIENTES CON CPNM Y CONTROLES

Para el análisis de las diferencias en el repertorio TCR- β entre pacientes con CPNM e individuos control, se estudiaron muestras de sangre periférica de 33 pacientes y 7 controles sanos. Tras secuenciación de la región CDR3 de la cadena β del TCR, se analizaron los índices que permiten una visión global de todo el repertorio: riqueza, equidad y convergencia. La comparación de estas características se realizó usando la prueba *U* de Mann-Whitney (Tabla 15).

Tabla 15. Índices de riqueza, equidad y convergencia del repertorio de TCR- β en pacientes con CPNM y controles sanos.

	Riqueza	Equidad	Convergencia
Controles sanos	59116 (46602 – 83716)	0,8088 (0,6236 – 0,9347)	0,0114 (0,0074-0,0186)
CPNM pacientes	33284 (15751 – 67686)	0,8263 (0,6136 – 0,9566)	0,0094 (0,0030 – 0,2192)
<i>p</i> valor	<0,001	0,557	0,403

P valores obtenidos en la prueba *U* de Mann-Whitney. Los valores corresponden a la mediana para cada índice, entre paréntesis se indica el rango para cada parámetro. CPNM: cáncer de pulmón no microcítico.

Los resultados de este análisis pusieron de manifiesto que la riqueza se encontraba más elevada en los individuos sanos con respecto a la muestra basal analizada en los pacientes con CPNM ($p < 0,001$; Figura 35); sin embargo, en los índices que se calculan normalizando los valores (equidad y convergencia), no se encontraron diferencias entre ambos grupos.

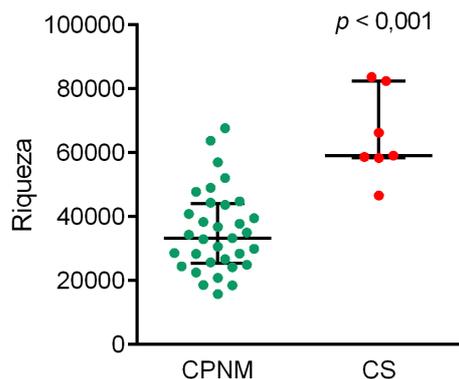


Figura 35. Comparación del índice de riqueza entre pacientes con CPNM en estadios avanzados y controles. *P* valor obtenido en la prueba *U* de Mann-Whitney. La línea central representa la mediana, mientras que las líneas superior e inferior muestran el rango intercuartil. Cada punto representa a un sujeto. CPNM: pacientes con cáncer de pulmón no microcítico en estadios avanzados (muestra previa al inicio del tratamiento), en verde; CS: controles sanos, en rojo.

Consistente con nuestros resultados, Liu et al. han encontrado que los pacientes con CPNM en estadios avanzados muestran un número de clonotipos en sangre periférica significativamente más bajos en comparación con los individuos sanos (Y. Liu et al., 2019). Los análisis en muestras de tejido reportados por Reuben et al. indican que los tejidos pulmonares de donantes de pulmón sanos también presentan una mayor riqueza de clonotipos TCR que los tejidos tumorales de pacientes con cáncer de pulmón en estadios I a III (Reuben et al., 2020).

El análisis de componentes principales (PCA) no supervisado de los segmentos V mostró que los pacientes con CPNM y los individuos sanos se agrupaban de manera diferente (Figura 36), lo que daba a entender que existían diferencias en las frecuencias de los TRBV entre los pacientes y los controles.

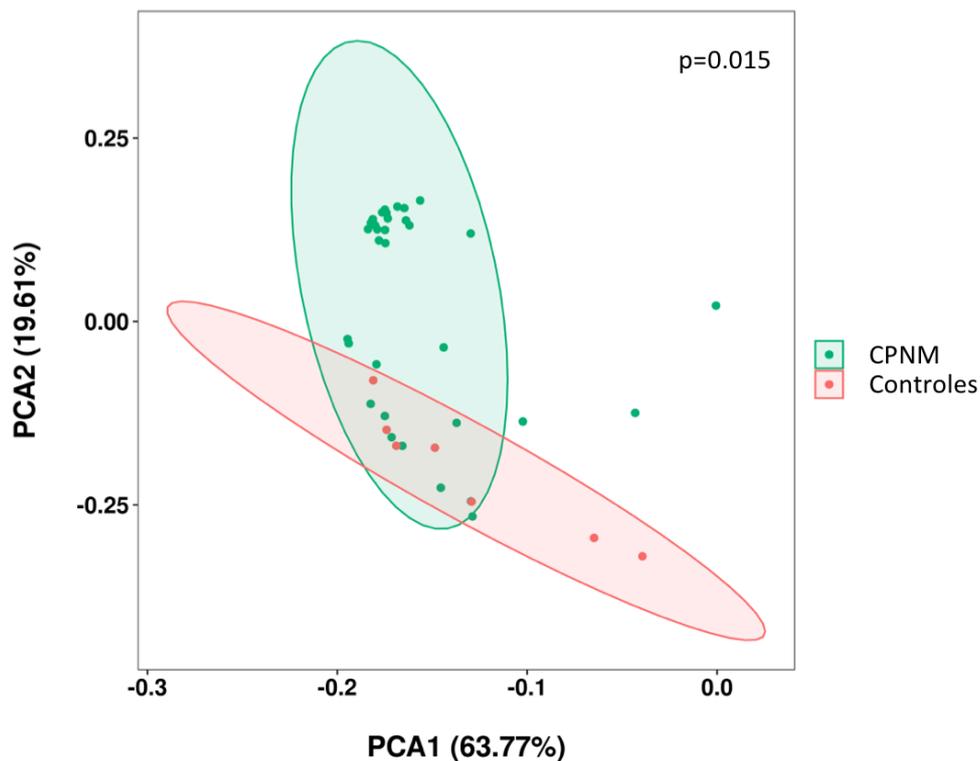


Figura 36. Análisis de componentes principales (PCA) en pacientes con CPNM en estadios avanzados y controles. *P* valor obtenido en el análisis de ANOSIM. Cada punto representa una muestra, y los puntos del mismo color pertenecen al mismo grupo; en verde se señalan los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) en estadios avanzados y en rojo los individuos control.

Por otra parte, el análisis de los segmentos V reveló que 5 segmentos V exhibieron frecuencias significativamente diferentes entre pacientes e individuos control. De estos fragmentos, TRBV4-2 ($p= 0,006$), TRBV5-4 ($p= 0,003$), TRBV18 ($p= 0,016$) y TRBV29-1 ($p= 0,008$) estaban presentes en frecuencias más altas en pacientes con CPNM, mientras que TRBV9 ($p= 0,044$) fue más frecuente en controles sanos (Figura 37). No se observaron diferencias estadísticamente significativas para ningún segmento J entre CPNM pacientes y controles sanos.

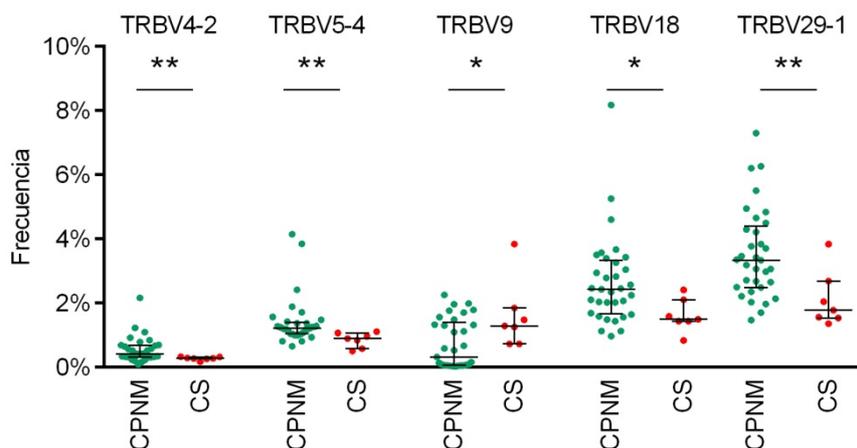


Figura 37. Comparación de frecuencias de segmentos V entre pacientes con CPNM en estadios avanzados y controles. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba *U* de Mann-Whitney. La línea central representa la mediana, mientras que las líneas superior e inferior muestran el rango intercuartil. Cada punto representa a un sujeto. CPNM: pacientes con cáncer de pulmón no microcítico en estadios avanzados, en verde; CS: controles sanos, en rojo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

En concordancia con nuestros resultados, mediante la secuenciación de la región TCR- β CDR3, un estudio previo ha demostrado la diferencia significativa del perfil de los fragmentos V β de linfocitos circulantes entre el grupo de pacientes con cáncer de pulmón en estadios avanzados y los controles sanos (Y. Liu et al., 2019). Asimismo, al comparar las frecuencias de segmentos V β de las células T en sangre periférica entre los grupos de cáncer de cuello uterino, neoplasia intraepitelial cervical y mujeres sanas, Cui et al. han observado 8 segmentos V β con diferencias significativas entre los tres grupos (Cui et al., 2018). Además, un estudio centrado en el cáncer colorrectal ha encontrado que a los pacientes con cáncer colorrectal se les presenta un repertorio del uso de los genes TRBV y TRBJ diferente en comparación con los controles sanos, y por lo tanto, ha concluyendo que el análisis de la presencia y frecuencia de los segmentos V y J del receptor TCR- β puede proporcionar un biomarcador potencial para el diagnóstico y el tratamiento de los pacientes con cáncer colorrectal (X. Liu et al., 2019).

En resumen, nuestros resultados demuestran que el repertorio de TCR- β en muestras de sangre periférica de pacientes con CPNM se puede diferenciar claramente del repertorio de individuos sanos en varios aspectos, por ejemplo, número de clonotipos y segmentos V compuestos. Además, estos cambios podrían indicar un estado inmunológico alterado

asociado con el cáncer de pulmón. Sin embargo, una limitación de este estudio, es la falta de datos de muestras de pacientes con CPNM en estadios tempranos para analizar posibles cambios del repertorio de TCR durante el proceso de progresión en este tipo de tumores, por lo que se están recogiendo muestras de pacientes en estadios resecables con el fin de tener una visión más completa de estos resultados.

5. CARACTERIZACIÓN DEL REPERTORIO DE TCR- β EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON CPNM AVANZADO TRATADOS CON BLOQUEANTES DE PD-1

Hay evidencias de que el análisis de los perfiles de TCRs proporciona información predictiva de respuesta a ICBs en varios tipos de tumores. Sin embargo, la mayoría de estudios se han enfocado en el análisis del repertorio en muestras de tejido tumoral (Anagnostou et al., 2019; Forde et al., 2018; Wang et al., 2019; Zhang et al., 2020). Como mencionamos anteriormente, la evaluación del repertorio de TCR- β en sangre periférica presenta potencialmente una serie de ventajas en comparación con la evaluación del tejido tumoral, ya que permite un acceso mínimamente invasivo al material biológico, una monitorización a lo largo del curso clínico de la enfermedad y sobre todo, en tiempo real.

5.1. ANÁLISIS DE RIQUEZA, EQUIDAD Y CONVERGENCIA DEL REPERTORIO TCR- β

Para caracterizar el repertorio TCR- β , se analizaron en primer lugar los índices que valoran las características globales del mismo. En este caso, el análisis incluyó tanto a las muestras basales recogidas (PRE) como a las que se tomaron en el momento de la primera evaluación de la respuesta (1E). Los valores de riqueza, equidad y convergencia en las muestras analizadas están recogidos en la Tabla 16. Se observó que los tres parámetros no presentaron diferencias significativas entre las muestras PRE y 1E ($p= 0,658$, $p= 0,809$ y $p=$

0,107, respectivamente; Figura 38).

Tabla 16. Valores de los índices del repertorio de TCR-β para cada paciente.

	Riqueza		Equidad		Convergencia	
	PRE	1E	PRE	1E	PRE	1E
P1	39511	25576	0,8167	0,8783	0,0055	0,0032
P2	28465	28640	0,8673	0,8170	0,0164	0,0417
P3	28652	27542	0,7396	0,8288	0,0138	0,0092
P4	35072	17238	0,9547	0,9232	0,0101	0,0114
P5	33284	37288	0,7956	0,8359	0,0122	0,0087
P6	32937	41808	0,7622	0,8189	0,0645	0,0415
P7	22544	12140	0,7120	0,6733	0,0048	0,0029
P8	24246	30786	0,6993	0,8244	0,2192	0,0726
P9	18582	44582	0,8582	0,8389	0,0050	0,0095
P10	26728	34875	0,8539	0,8144	0,0077	0,0046
P11	57036	66973	0,9164	0,9076	0,0101	0,0093
P12	36809	30903	0,9515	0,9616	0,0074	0,0036
P13	44776	23596	0,9566	0,9638	0,0078	0,0060
P14	63816	47606	0,8216	0,7926	0,0081	0,0069
P15	25723	69067	0,9429	0,9213	0,0030	0,0101
P16	20891	26722	0,6136	0,5769	0,0098	0,0085
P17	38381	58561	0,8555	0,8117	0,0194	0,0101
P18	49062	27370	0,7585	0,8007	0,0233	0,0132
P19	47770	84373	0,9433	0,9440	0,0122	0,0141
P20	28337		0,7560		0,0082	
P21	43699		0,8263		0,0090	
P22	34404		0,6944		0,0959	
P23	24979		0,8173		0,0039	
P24	18629		0,9148		0,0049	
P25	29921		0,8948		0,0109	
P26	40861		0,8208		0,0048	
P27	44387		0,7394		0,0094	
P28	30642		0,7660		0,0045	
P29	52145		0,7251		0,0107	
P30	37828		0,8609		0,0053	
P31	67686		0,9465		0,0095	
P32	15751		0,9480		0,0054	
P33	24425		0,8769		0,0608	

P: paciente; PRE: muestras pretratamiento; 1E: muestras de la primera evaluación de respuesta.

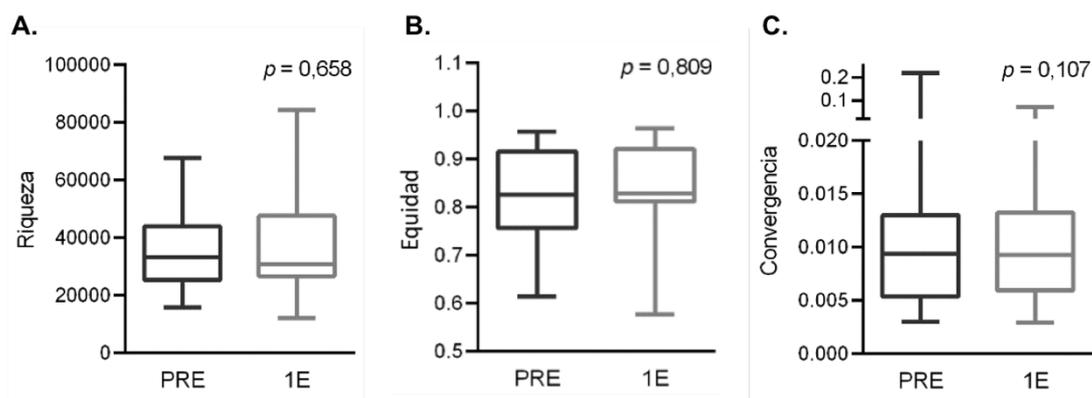


Figura 38. Análisis de los índices de riqueza (A), equidad (B) y convergencia (C) obtenidos de la secuenciación del repertorio de TCR- β entre muestras basales y la primera evaluación de respuesta. *P* valores obtenidos en la prueba de Wilcoxon. La línea central representa la mediana, mientras que las barras de error superior e inferior muestran el valor mínimo y el máximo. PRE: pretratamiento; 1E: primera evaluación de respuesta.

A través del uso de los parámetros de diversidad (riqueza y equidad) en la caracterización del repertorio de TCR, se ha facilitado la complejidad del análisis de datos de secuenciación; y en el contexto de estudio clínico, se pueden relacionar fácilmente con los factores de pronóstico y la respuesta a terapias (Aversa et al., 2020). Los primeros estudios sobre el análisis del repertorio de TCR y relación con la respuesta a ICBs se centraron en la riqueza y la clonalidad (equidad) de TCR en pacientes con melanoma metastásico (Hogan et al., 2019; Khunger et al., 2019; Looney et al., 2020; Postow et al., 2015; Robert et al., 2014; Tumei et al., 2014; Yusko et al., 2019). Posteriormente, estos índices fueron utilizados en la investigación del impacto del patrón de TCR en el cáncer de pulmón (Forde et al., 2018; Han et al., 2020; Wang et al., 2019; Zhang et al., 2020). Sin embargo, la interpretación de los resultados ha sido complicada por el hecho de que tanto la diversidad alta como baja en el tejido tumoral o en la sangre periférica puede asociarse con una mejor respuesta a ICBs. Por lo tanto, se requieren estudios más precisos para confirmar el análisis de diversidad del repertorio de TCR como un biomarcador novedoso.

En cuanto a la convergencia, existen pocos datos en pacientes con cáncer hasta la fecha. Más recientemente, Looney et al. han demostrado que la convergencia tiene utilidad en predecir la respuesta a inmunoterapia; además, *Ion Torrent* es la tecnología más apropiada disponible al momento para estudiar los clonotipos convergentes de TCR (Looney et al., 2020).

5.1.1. CORRELACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Se realizaron las pruebas no paramétricas (prueba *U* de Mann-Whitney) para correlacionar riqueza, equidad y convergencia del repertorio TCR en las muestras basales con variables demográficas y clínico-patológicas. Los resultados de estos análisis se muestran en la Tabla 17.

No se encontraron asociaciones significativas en función de la edad. Sin embargo, se ha observado que la diversidad del repertorio de TCR- β disminuye significativamente después de los 40 años en un estudio realizado en personas sanas de edades entre 6 y 90 años (Britanova et al., 2014). En nuestra cohorte, los pacientes fueron de edades relativamente mayores (mediana= 65 años, rango: 45 – 87 años), lo que podría explicar esta falta de correlación en función de la edad reportada en estudios previos.

De destacar, los datos obtenidos en relación con el hábito tabáquico. Se observó una diferencia significativa entre el hábito de fumar y la riqueza de TCR- β en muestras basales ($p= 0,040$), siendo los fumadores los que presentaban menor número de clonotipos diferentes de células T que los no fumadores (exfumadores + nunca fumadores) (Figura 39). El hábito de fumar se considera el factor de riesgo más importante para el cáncer de pulmón. Aunque los fumadores tienen en general una TMB más alta, lo que puede mejorar la eficacia de los ICBs (Rizvi et al., 2015), los no fumadores todavía tienen una SG más prolongada que los fumadores (Singal et al., 2019). Hernandez et al. han demostrado que fumar puede inhibir la proliferación de células T al inducir la apoptosis, relacionada con especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Hernandez et al., 2013). Nuestros resultados confirman el efecto adverso del tabaquismo sobre el sistema inmune.

En relación con otras variables como la histología, expresión de PD-L1, estadio, o el número de localizaciones metastásicas, no se encontraron asociaciones significativas.

Tabla 17. Correlaciones entre los índices de riqueza, equidad y convergencia del repertorio de TCR-β basal y variables demográficas/clínico-patológicas.

Índices PRE		Variables		
Edad				
	<65 años	≥65 años		p valor
Riqueza	31603 (24246 – 67686)	35072 (15751 – 63816)		0,885
Equidad	0,8353 (0,6944 – 0,9566)	0,8263 (0,6136 – 0,9546)		0,746
Convergencia	0,0101 (0,0030 – 0,2192)	0,0081 (0,0039-0,0645)		0,130
Hábito tabáquico				
	Fumador	No fumador		p valor
Riqueza	29921 (15751 – 67686)	41579 (24979 – 63816)		0,040 *
Equidad	0,8263 (0,6136 – 0,9546)	0,8386 (0,7585 – 0,9566)		0,355
Convergencia	0,0094 (0,0030 – 0,2192)	0,0091 (0,0039 – 0,0645)		0,585
Histología				
	ADC	No ADC		p valor
Riqueza	31603 (15751 – 67686)	34404 (20891 – 49062)		0,686
Equidad	0,8568 (0,6993 – 0,9566)	0,7660 (0,6136 – 0,9515)		0,225
Convergencia	0,0088 (0,0030 – 0,2192)	0,0098 (0,0039 – 0,0959)		0,544
PD-L1 TPS				
	<50%	≥50%		p valor
Riqueza	37828 (15751-67686)	33111 (18582-63816)		0,467
Equidad	0,8609 (0,7251-0,9480)	0,8239 (0,6136-0,9566)		0,657
Convergencia	0,0094 (0,0045-0,0608)	0,0094 (0,0030-0,2192)		0,442
Estadio				
	IIIA/IIIB/IIIC	IVA/IVB		p valor
Riqueza	41087 (20891 – 57036)	32937 (15715 – 67686)		0,455
Equidad	0,7879 (0,6136 – 0,9440)	0,8539 (0,6993 – 0,9566)		0,304
Convergencia	0,0112 (0,0039 – 0,0959)	0,0082 (0,0030 – 0,2192)		0,225
Tamaño tumoral				
	≤5 cm	>5 cm		p valor
Riqueza	35072 (18582 – 67686)	31963 (15751 – 63816)		0,827
Equidad	0,8582 (0,6136 – 0,9566)	0,8189 (0,6944 – 0,9480)		0,259
Convergencia	0,0094 (0,0030 – 0,0645)	0,0091 (0,0039 – 0,2192)		0,942
Nº. localizaciones metastásicas				
	≤2	>2		p valor
Riqueza	33844 (15751 – 63816)	30642 (18582 – 67686)		0,768
Equidad	0,8170 (0,6136 – 0,9566)	0,8555 (0,7120 – 0,9465)		0,632
Convergencia	0,0101 (0,0039 – 0,2192)	0,0077 (0,0030 – 0,0608)		0,071

P valores obtenidos en la prueba U de Mann-Whitney. Los valores corresponden a la mediana para cada índice según la característica clínico-patológica y, entre paréntesis, el rango. PRE: pretratamiento; No fumador: nunca fumador y exfumador; ADC: adenocarcinoma; No ADC: carcinomas escamosos, de células grandes o pobremente diferenciados; PD-L1 TPS: la expresión de PD-L1 se evaluó mediante puntuaciones de proporción de tumores (TPS, *tumor proportion score*). *p <0,05.

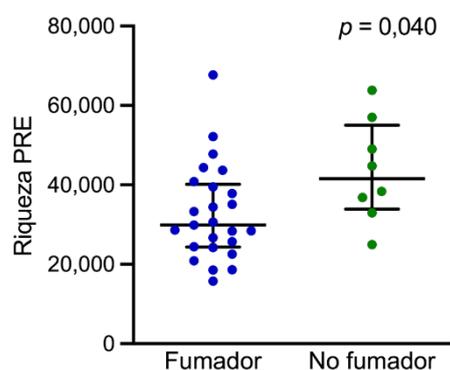


Figura 39. Relación de la riqueza de TCR-β en sangre periférica basal con el hábito de fumar. *P* valor obtenido en la prueba *U* de Mann-Whitney. La línea central representa la mediana, mientras que las líneas superior e inferior muestran el rango intercuartil. Cada punto representa a un paciente. No fumador (nunca fumador + exfumador). PRE: pretratamiento.

También se evaluó la relación de las características del repertorio de TCR al inicio del tratamiento con el recuento de linfocitos en sangre periférica (ALC; del inglés, *absolute lymphocyte count*) y el ratio de neutrófilos/linfocitos (NLR; del inglés, *neutrophil to lymphocyte ratio*), utilizando la correlación de rango de Spearman. ALC y NLR son dos factores que se estudian como marcadores de inflamación sistémica y, en nuestra cohorte, no se observaron asociaciones con los valores de los índices de riqueza, equidad o convergencia (Tabla 18).

Tabla 18. Relación entre los índices de riqueza, equidad y convergencia del repertorio de TCR-β basal y factores de inflamación sistémica (ALC y NLR).

		Coefficiente de correlación	<i>p</i> valor
Riqueza	ALC	0,490	0,786
	NLR	-0,178	0,322
Equidad	ALC	-0,051	0,778
	NLR	-0,028	0,878
Convergencia	ALC	0,036	0,843
	NLR	-0,092	0,612

P valores obtenidos en la prueba de correlación de Spearman. ALC: recuento de linfocitos en sangre periférica; NLR: ratio de neutrófilos/linfocitos.

Se ha propuesto que ALC y NLR pueden tener valor pronóstico y predictivo en pacientes con cáncer de pulmón, pero no están validados de forma prospectiva (Galvano et al., 2020; Karantanos et al., 2019). Liu et al. observaron una correlación significativa negativa entre la diversidad basal de TCR y NLR en los pacientes con CPNM tratados con quimioterapia,

radioterapia o terapia dirigida (Y. Liu et al., 2019). Los resultados inconsistentes entre el presente estudio y el de Liu et al. muestran que la asociación de los TCRs con los factores de inflamación sistémica aún necesita ser verificada en estudios más precisos.

5.1.2. CORRELACIÓN CON RESPUESTA Y VARIABLES PRONÓSTICAS

5.1.2.1. VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

De los 33 pacientes con CPNM en estadios avanzados de la cohorte, obtuvieron BCD un 67% de ellos (12 RP y 10 EE), mientras que en 33% fueron categorizados como no BCD. La mediana de seguimiento fue de 12,1 meses [rango: 3,07 – 21,7 meses] en el presente estudio. Durante el período de seguimiento un 48,5% de los pacientes progresaron y se registraron un 36,4% de exitus.

Los análisis de correlación entre las variables clínico-patológicas y el beneficio clínico se realizaron usando la prueba exacta de Fisher y los resultados obtenidos se muestran en Tabla 19. No se observaron diferencias significativas en las variables demográficas/clínico-patológicas analizadas entre los grupos con BCD y no BCD.

Tabla 19. Correlación entre variables demográficas/clínico-patológicas y beneficio clínico.

Variables	No BCD (n= 11)	BCD (n= 22)	p valor
Edad			
≤65 años	5 (45,5%)	11 (50%)	1,000
>65 años	6 (54,5%)	11 (50%)	
Sexo			
Hombre	8 (72,7%)	16 (72,7%)	1,000
Mujer	3 (27,3%)	6 (27,3%)	
Hábito tabáquico			
Fumador	3 (27,3%)	5 (22,7%)	1,000
No fumador	8 (72,7%)	17 (77,3%)	
Histología			
Adenocarcinoma	7 (63,6%)	17 (77,3%)	0,438
No adenocarcinoma	4 (36,4%)	5 (22,7%)	
PD-L1 TPS			
<50%	3 (27,3%)	6 (27,3%)	1,000
≥50%	8 (72,7%)	16 (72,7%)	
Estadio			
IIIA/IIIB/IIIC	3 (27,3%)	3 (13,6%)	0,375
IVA/IVB	8 (72,7%)	19 (86,4%)	
Tamaño tumoral			
≤5 cm	6 (54,5%)	13 (59,1%)	1,000
>5 cm	5 (45,4%)	9 (40,9%)	
Nº. localizaciones metastásicas			
<2	8 (72,7%)	12 (54,5%)	0,456
≥2	3 (27,3%)	10 (45,4%)	

P valores obtenidos en la prueba exacta de Fisher. No fumador: nunca fumador y exfumador. No adenocarcinoma: carcinomas escamosos, de células grandes o pobremente diferenciados. PD-L1 TPS: la expresión de PD-L1 se evaluó mediante puntuaciones de proporción de tumores (TPS, *tumor proportion score*). Tamaño de tumor y número de localizaciones metastásicas dicotomizados según las medianas.

El valor pronóstico de las diferentes variables demográficas/clínico-patológicas se llevó a cabo mediante el método de regresión de Cox univariante para la SLP y SG. Los resultados para cada variable se muestran en la Tabla 20. En este análisis no se encontró ninguna asociación significativa entre la SLP y SG con las variables clínico-patológicas analizadas.

Tabla 20. Resultados del análisis de Cox univariante para variables demográficas/ clínico-patológicas.

Variables	SLP			SG		
	HR	95%CI	p valor	HR	95%CI	p valor
Edad ≤65 años vs. >65 años	1,654	0,600–4,562	0,331	1,269	0,402–4,004	0,684
Sexo Hombre vs. Mujer	1,464	0,532–4,033	0,461	1,848	0,586–5,832	0,295
Hábito tabáquico Fumador vs. No fumador	0,879	0,283–2,733	0,824	0,599	0,180–1,991	0,403
Histología ADC vs. No ADC	1,587	0,547–4,556	0,399	1,698	0,510–5,651	0,388
PD-L1 TPS ≥50% vs. <50%	0,857	0,274–2,679	0,790	1,655	0,489–5,598	0,418
Estadio IIIA/IIIB/IIIC vs. IVA/IVB	0,409	0,131–1,278	0,124	0,493	0,133–1,826	0,290
Tamaño tumoral ≤5 cm vs. >5 cm	0,947	0,342–2,623	0,917	1,541	0,491–4,840	0,459
Nº. localizaciones metastásicas <2 vs. ≥2	0,564	0,196–1,627	0,290	1,101	0,349–3,474	0,870

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el método de regresión de Cox univariante. No fumador: nunca fumador o exfumador; ADC: adenocarcinoma; No ADC: carcinomas escamosos, de células grandes o pobremente diferenciados; PD-L1 TPS: la expresión de PD-L1 se evaluó mediante puntuaciones de proporción de tumores (TPS, *tumor proportion score*). Tamaño tumoral y número de localizaciones metastásicas dicotomizados según las medianas.

Hasta la fecha, los resultados de las correlaciones de las características demográficas o clínico-patológicas con las variables pronósticas presentan datos contradictorios. Los factores demográficos como el sexo masculino, la edad y el hábito de fumar han demostrado estar asociado con un mal pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón (Kuo et al., 2014; Shao et al., 2014). Sin embargo, en concordancia con nuestros resultados, otros análisis en cáncer de pulmón no encuentran valor pronóstico en estas variables demográficas (Y. Liu et al., 2019; Sun et al., 2006). En cuanto a las características clínico-patológicas, la estadificación basada en el sistema TNM, es un factor que proporciona estimación de pronóstico sobre todo para la SG (Blandin Knight et al., 2017). Sin embargo, en nuestra cohorte, todos los pacientes fueron diagnosticados como CPNM en estadios avanzados, lo que podría explicar la ausencia de correlación con el estadio, el tamaño tumoral y el número de localizaciones metastásicas con la supervivencia. En este sentido, varios estudios centrados en pacientes con CPNM en estadios avanzados tratados con anti-PD-1/anti-PD-L1 analizaron la relación entre las

características clínico-patológicas y, al igual que en nuestro caso, no han observado asociaciones significativas (Han et al., 2020; Naidus et al., 2021; P. Song et al., 2020).

5.1.2.2. ANÁLISIS DE LOS ÍNDICES DE RIQUEZA, EQUIDAD Y CONVERGENCIA EN MUESTRAS BASALES

A continuación, se realizó el estudio de correlación entre la respuesta al tratamiento y los índices del repertorio de TCR- β en las muestras basales. El análisis de correlación con la respuesta y los índices de riqueza, equidad y convergencia de las muestras basales se llevó a cabo mediante la estadística no paramétrica (prueba *U* de Mann-Whitney) sin observar diferencias estadísticamente significativas en las muestras basales respecto a los índices estudiados ($p= 0,208$, $p= 0,541$ y $p= 0,620$, respectivamente; Figura 40). Sin embargo, los pacientes con BCD mostraron una mediana de la riqueza más baja en comparación con los pacientes que progresaron dentro de los 6 meses posteriores al inicio del tratamiento (Figura 40 A).

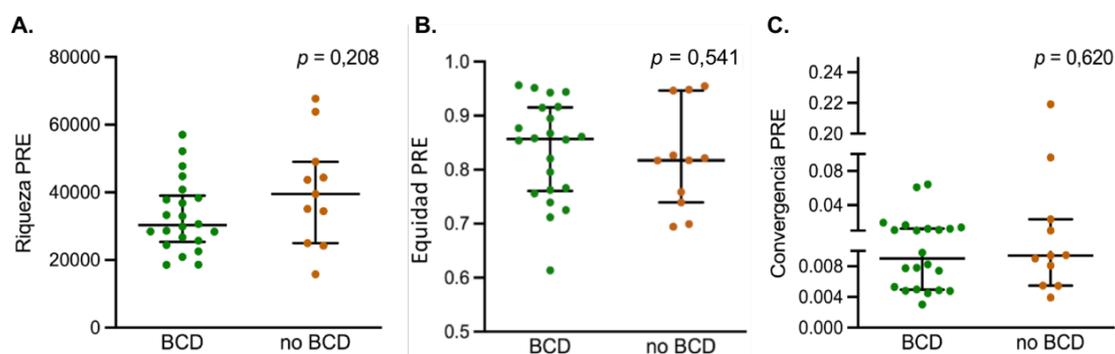


Figura 40. Correlación entre los índices de riqueza (A), equidad (B) y convergencia (C) del repertorio TCR- β en las muestras basales y el beneficio clínico. *P* valores obtenidos en la prueba *U* de Mann-Whitney. La línea central representa la mediana, mientras que las líneas superior e inferior muestran el rango intercuartil. Cada punto representa a un paciente (BCD: beneficio clínico duradero, en verde; no BCD: no beneficio clínico duradero, en naranja). PRE: pretratamiento.

Posteriormente, se procedió a evaluar el valor pronóstico de los índices analizados del repertorio de TCR- β en muestras basales mediante el modelo de regresión de Cox univariante para la SLP y SG. Cada índice fue dicotomizado de acuerdo a la mediana en "alto" (\geq mediana) y "bajo" ($<$ mediana). Siendo las medianas para riqueza, equidad y convergencia las siguientes: 33284, 0,8263 y 0,0094, respectivamente. Los resultados se muestran en la 96

Tabla 21.

Tabla 21. Análisis de Cox univariante basado en los índices de riqueza, equidad y convergencia en las muestras basales.

Variables	SLP			SG		
	HR	95%CI	p valor	HR	95%CI	p valor
Riqueza PRE alto vs. bajo	2,560	0,919–7,131	0,072	2,981	0,892–9,960	0,076
Equidad PRE alto vs. bajo	0,443	0,160–1,227	0,117	0,420	0,126–1,399	0,158
Convergencia PRE alto vs. bajo	0,649	0,236–1,788	0,403	0,563	0,169–1,872	0,349

P valores obtenidos en el análisis de Cox univariante. Los valores de cada índice dicotomizados en “alto” y “bajo” tomando como punto de corte la mediana. PRE: pretratamiento; SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global; HR: tasas de riesgo (*hazard ratio*); 95%CI: intervalo de confianza del 95% (*95% confidence interval*).

Los índices de riqueza, equidad y convergencia en las muestras tomadas previo al inicio del tratamiento no mostraron asociaciones significativas con las variables pronósticas. Sin embargo, al realizar los análisis de supervivencia con el método de *Kaplan-Meier*, se mostró una tendencia en la que los pacientes con SLP y SG más prolongadas presentaban una menor riqueza en las muestras basales analizadas (SLP: 4,87 meses vs. mediana no alcanzada, $p=0,062$; SG: 12,07 meses vs. mediana no alcanzada, $p=0,063$; Figura 41 A, B) y mayor equidad (SLP: mediana no alcanzada vs. 6,67 meses, $p=0,106$; SG: medianas no alcanzadas, $p=0,145$; Figura 41 C, D).

Basándonos en estas observaciones, nos planteamos que la presencia de una menor riqueza en el TCR (es decir, una amplitud restringida de clones) y una alta equidad (es decir, menor clonalidad o mayor diversidad) en el repertorio de TCR- β en sangre periférica previo al tratamiento puede tener un valor pronóstico favorable, lo que indicaría una activación de poblaciones específicas de las células T capaces de reconocer los neoantígenos asociados al tumor, con una expansión periférica que presenta una mayor similitud en el tamaño de sus clones. En concordancia con nuestros hallazgos, Han et al. han demostrado que al analizar las PBMCs no se observa asociación entre la diversidad de TCR basal y la respuesta a anti-PD-1/anti-PD-L1; sin embargo, al analizar las células T PD-1+ CD8+ periféricas aisladas, una mayor diversidad al inicio del tratamiento se asocia con beneficio clínico y mayores SLP,

sugiriendo que la existencia de un repertorio de TCRs no específicos para neoantígenos tumorales en sangre periférica podría “diluir” al conjunto de TCR específicos para neoantígenos propios de un tumor (Han et al., 2020).

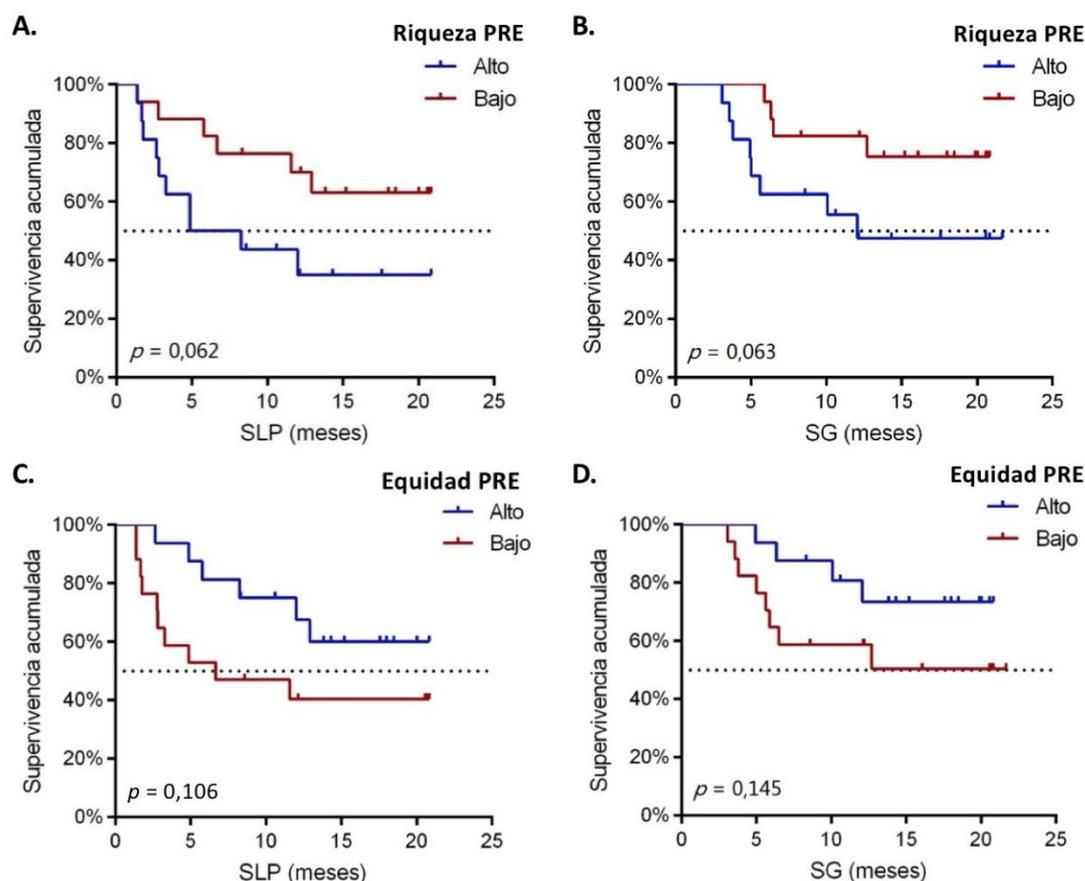


Figura 41. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de acuerdo a los índices de riqueza y equidad del repertorio TCR-β en muestras basales. A-B. Supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG) de acuerdo a la riqueza. C-D. SLP y SG de acuerdo a la equidad. Cada índice fue dicotomizado con respecto a la mediana (riqueza, mediana= 33284; equidad, mediana= 0,8263), valores por encima de la mediana= alto (línea azul) y valores por debajo de la mediana= bajo (línea roja). *P* valores obtenidos en el test de log-rango. PRE: pretratamiento.

Al analizar la convergencia de TCR-β no se observaron diferencias respecto a la respuesta y a la supervivencia. Sin embargo, Looney et al. han demostrado que la convergencia es un marcador predictivo de respuesta a la inmunoterapia. Mediante la secuenciación completa de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de TCR-β encontraron que los pacientes con melanoma, adenocarcinoma de células claras o carcinoma de próstata respondedores a anti-CTLA-4 presentaban una convergencia más alta frente a los no respondedores en las muestras previas a tratamiento, reforzando la teoría de que las células

T convergentes representan una activación crónica contra antígenos tumorales (Looney et al., 2020). Nuestros resultados no concuerdan con los reportados en este trabajo aunque cabe señalar que nuestra cohorte corresponde a pacientes con cáncer de pulmón tratados con un bloqueante de PD-1 a diferencia del estudio de Looney et al. que analizaba pacientes con otros tipos tumorales tratados con anti-CTLA-4, además de una secuenciación de TCR que implica a regiones más extensas en el caso de la publicación antes mencionada.

5.1.2.3. ANÁLISIS DE LOS ÍNDICES DE RIQUEZA, EQUIDAD Y CONVERGENCIA EN LA PRIMERA EVALUACIÓN DE RESPUESTA

Los resultados obtenidos para las secuencias de 19 muestras en la primera evaluación de respuesta al tratamiento se representan en la Figura 42. No se evidenciaron diferencias significativas para la riqueza, equidad y convergencia entre los pacientes que presentaban BCD frente a los no BCD ($p = 0,195$, $p = 0,643$ y $p = 0,579$, respectivamente). Sin embargo, se evidenció una tendencia a presentar mayor riqueza en los pacientes con BCD que los no BCD en las muestras sanguíneas tomadas en la primera evaluación de respuesta (Figura 42 A).

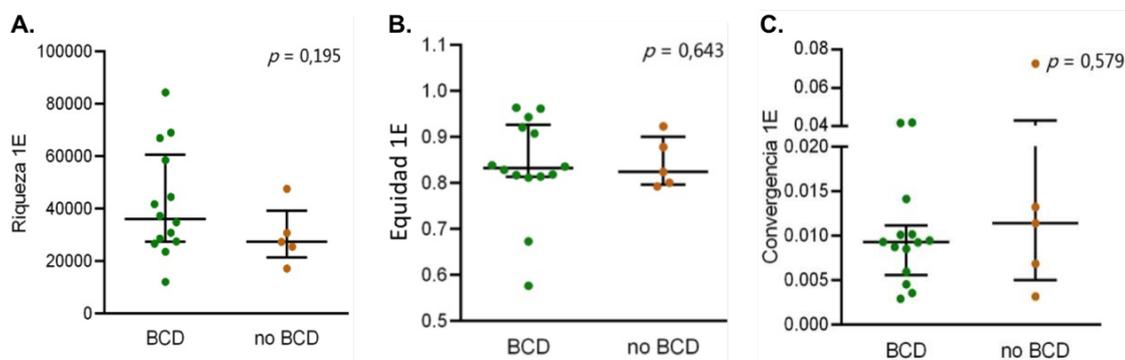


Figura 42. Correlación entre los índices de riqueza (A), equidad (B) y convergencia (C) del repertorio TCR- β en las muestras de la primera evaluación y el beneficio clínico. P valores obtenidos en la prueba U de Mann-Whitney. La línea central representa la mediana, mientras que las líneas superior e inferior muestran el rango intercuartil. Cada punto representa a un paciente (BCD: beneficio clínico duradero, en verde; no BCD: no beneficio clínico duradero, en naranja). 1E: primera evaluación de respuesta.

Para el análisis univariante de Cox se empleó la mediana de cada índice en las muestras tomadas en la primera evaluación (Riqueza, mediana= 30903; Equidad, mediana= 0,8303; Convergencia, mediana= 0,0093), los pacientes se clasificaron en grupos "alto" (\geq mediana) y "bajo" ($<$ mediana) para evaluar el valor pronóstico. Los resultados obtenidos utilizando el

método de regresión de Cox univariante se resumen en la Tabla 22.

Tabla 22. Análisis de Cox univariante basado en los índices de riqueza, equidad y convergencia en las muestras a la primera evaluación de respuesta.

Variables	SLP			SG		
	HR	95%CI	p valor	HR	95%CI	p valor
Riqueza 1E alto vs. bajo	0,110	0,013–0,895	0,039*	0,261	0,029–2,338	0,230
Equidad 1E alto vs. bajo	0,495	0,118–2,079	0,337	0,185	0,021–1,659	0,132
Convergencia 1E alto vs. bajo	0,744	0,177–3,117	0,686	0,811	0,135–4,862	0,819

Los valores de cada índice dicotomizados en “alto” y “bajo” tomando como punto de corte la mediana. P valores obtenidos en el análisis de Cox univariante. 1E: primera evaluación de respuesta; SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global; HR: tasas de riesgo (*hazard ratio*); 95%CI: intervalo de confianza del 95% (*95% confidence interval*). * $p < 0,05$

Niveles elevados en la riqueza en la muestra 1E se asoció con menor riesgo de progresión (HR= 0,110, IC95% 0,013–0,895, $p= 0,039$).

Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier mostraron que pacientes con alta riqueza en el momento de la primera evaluación tenían una SLP más prolongada (mediana no alcanzada vs. 6,67 meses, $p= 0,012$; Figura 43).

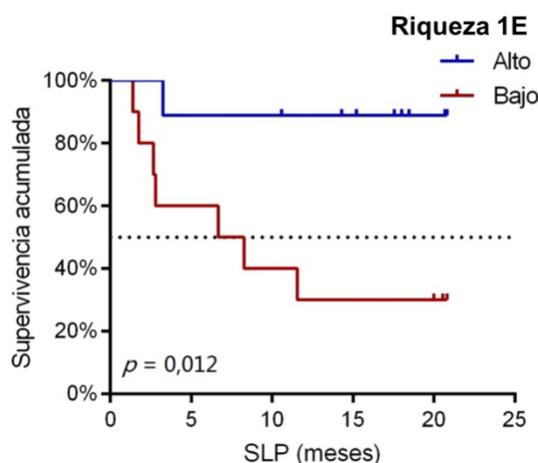


Figura 43. Curvas de supervivencia libre de progresión (SLP) Kaplan-Meier de acuerdo al índice de riqueza del TCR-β de la primera evaluación de respuesta. La riqueza 1E fue dicotomizada con respecto a la mediana (mediana= 30903) en grupos alto (línea azul) y bajo (línea roja). P valor obtenido en el test de log-rango. 1E: primera evaluación de respuesta.

De manera similar, un estudio previo que analizó el repertorio de TCR circulante en

pacientes con melanoma metastásico tratados con nivolumab ha demostrado que la respuesta terapéutica está asociada con diferentes patrones de dinámica de diversidad de células T circulantes (Riaz et al., 2017). En este estudio, Riaz et al. mostraron que los índices de diversidad (riqueza y equidad) previo al tratamiento no fueron diferentes en cuanto a la respuesta; sin embargo, el aumento de la riqueza a la semana 4 después del inicio de tratamiento se asoció significativamente con el beneficio clínico a la terapia.

En vista de estos resultados, el siguiente paso en nuestro estudio fue el análisis de la dinámica de las características del repertorio TCR- β entre las muestras PRE y 1E durante el curso de inmunoterapia con pembrolizumab en estos pacientes.

5.1.2.4. DINÁMICAS DE LOS ÍNDICES DE RIQUEZA, EQUIDAD Y CONVERGENCIA

El estudio de la dinámica de los índices entre las muestras sanguíneas PRE y 1E indicó que, durante el tratamiento de inmunoterapia con anti-PD-1, el repertorio TCR- β presentó variaciones en diferentes sentidos, aumentando en algunos casos y disminuyendo en otros (Figura 44).

Cuando se analiza la dinámica en la riqueza durante el tratamiento, se encontró un aumento en 10 pacientes con BCD (10/14, 71,4%) a excepción de un solo paciente que no presentaba BCD (P8) (1/5, 20%; Figura 44 A). Los cambios del índice de equidad entre las muestras 1E frente a las muestras PRE del repertorio de TCR- β periféricos fueron de pequeña magnitud (Figura 44 B). Aunque en el índice de convergencia la dinámica no mostró una asociación a nivel global con el beneficio clínico, se encontraron pacientes P8, P9, P2 y P15 que presentaron patrones muy diferentes respecto a los clonotipos convergentes (Figura 44 C).

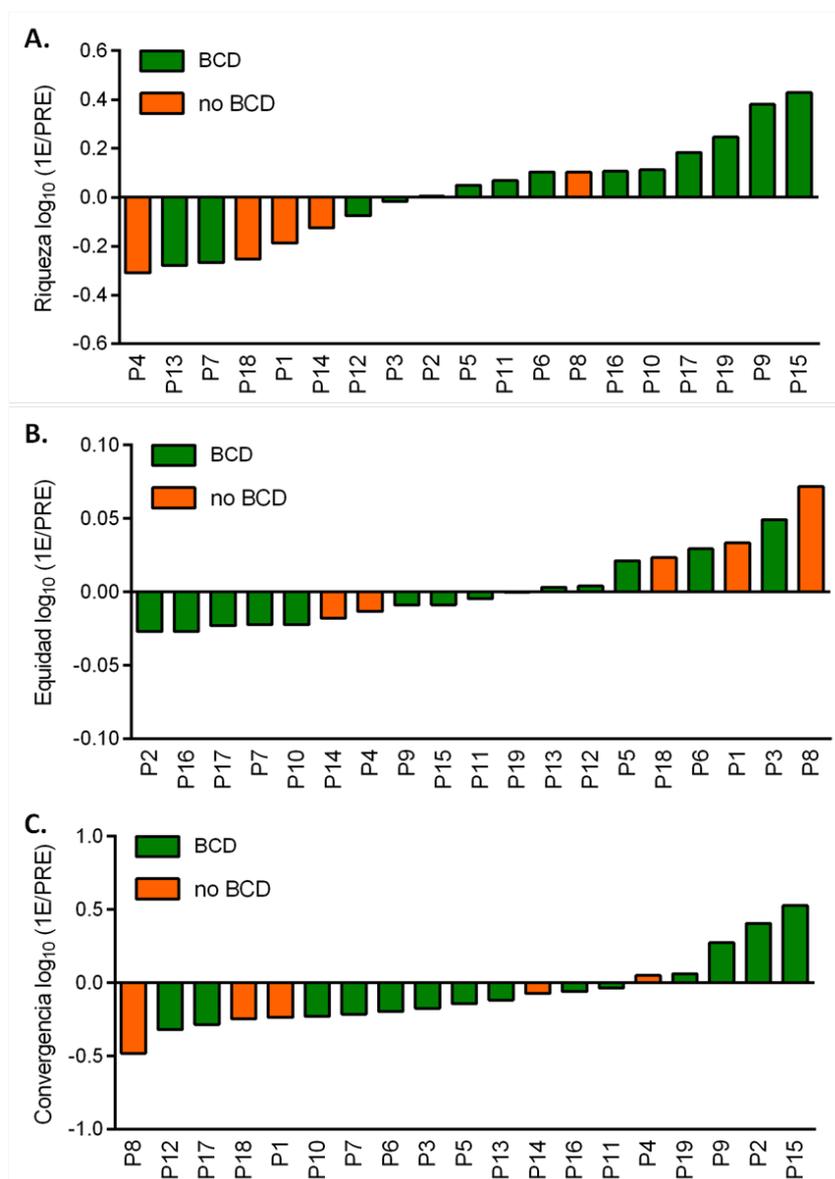


Figura 44. Dinámica de cambios producidos en los índices de riqueza (A), equidad (B) y convergencia (C) del repertorio TCR- β entre las muestras basales y de la primera evaluación de respuesta. Cada columna representa a un paciente (BCD: beneficio clínico duradero, en verde; no BCD: no beneficio clínico duradero, en naranja). El cambio de cada índice entre las muestras basales (PRE) y la primera evaluación de respuesta (1E) se definió como el logaritmo de la ratio 1E/PRE en base 10 ($\log_{10}(1E/PRE)$), donde un $\log_{10}(1E/PRE)$ mayor que 0 representa un aumento del valor del índice entre la muestra PRE y la 1E.

El análisis de correlaciones en la dinámica entre 1E/PRE con el beneficio clínico se realizó mediante la prueba no paramétrica *U* de Mann-Whitney. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 45. Se observó que los índices de riqueza aumentaron significativamente después del inicio de la inmunoterapia en pacientes con BCD versus no BCD ($p= 0,046$; Figura 45 A). Sin embargo, los cambios de equidad y convergencia fueron

similares respecto al beneficio clínico.

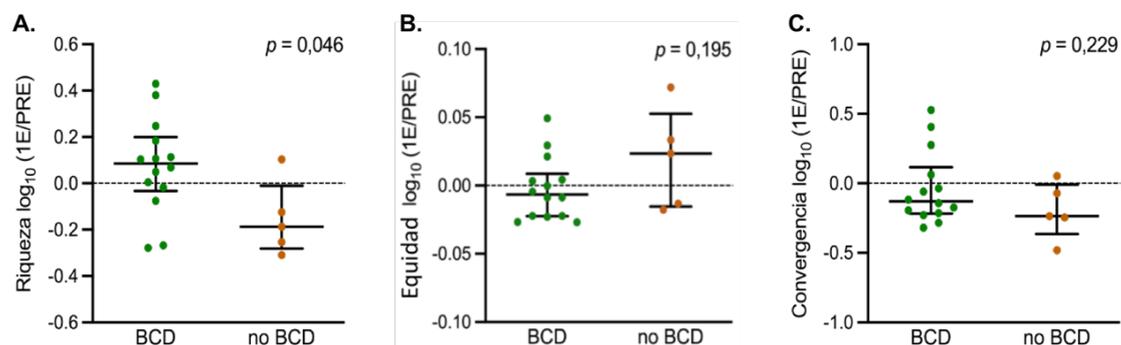


Figura 45. Correlación de las dinámicas de los índices de riqueza (A), equidad (B) y convergencia (C) del repertorio TCR-β entre las muestras basales y de la primera evaluación de respuesta con el beneficio clínico. Un $\log_{10} (1E/PRE) >0$ representa el aumento y se indica por encima de la línea discontinua. *P* valores obtenidos en la prueba *U* de Mann-Whitney. La línea central representa la mediana, mientras que las líneas superior e inferior muestran el rango intercuartil. Cada punto representa a un paciente (BCD: beneficio clínico duradero, en verde; no BCD: no beneficio clínico duradero, en naranja). PRE: pretratamiento; 1E: primera evaluación de respuesta.

Para analizar el valor pronóstico de las dinámicas del repertorio TCR-β, los pacientes se categorizaron de acuerdo con el cambio de cada índice en grupos “aumento” (↑) y “disminución” (↓). Al igual que en los análisis previos, en primer lugar se realizó el análisis de regresión univariante de Cox para SLP y SG. Los resultados se resumen en la Tabla 23.

Tabla 23. Análisis de Cox univariante basado en las dinámicas de los índices de riqueza, equidad y convergencia entre las muestras basales y de la primera evaluación de respuesta.

Variables	SLP			SG		
	HR	95%CI	<i>p</i> valor	HR	95%CI	<i>p</i> valor
Riqueza ↑ vs. ↓	0,143	0,028–0,727	0,019*	0,152	0,017–1,361	0,092
Equidad ↑ vs. ↓	1,690	0,422–6,771	0,459	2,343	0,391–14,053	0,351
Convergencia ↑ vs. ↓	0,372	0,046–3,026	0,355	0,029	0–105,043	0,397

P valores obtenidos en el análisis de Cox univariante. ↑: aumento; ↓: disminución; SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global; HR: tasas de riesgo (*hazard ratio*); 95%CI: intervalo de confianza del 95% (95% *confidence interval*). **p* <0,05.

El aumento de riqueza durante el tratamiento se asoció con menor riesgo de progresión (HR= 0,143, 95%CI 0,028–0,727, *p*= 0,019). Las curvas de Kaplan-Meier, muestran que la

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ganancia de riqueza 1E/PRE se asocia con una mayor SLP (mediana no alcanzada vs. 3,27 meses, $p= 0,007$; Figura 46 A) y SG (mediana no alcanzada vs. 12,70 meses, $p= 0,05$; Figura 46 B).

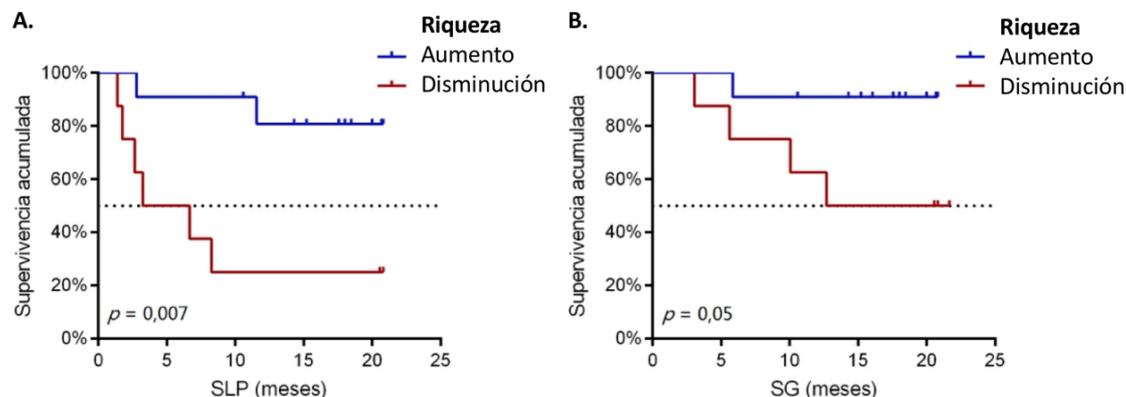


Figura 46. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier de acuerdo a los cambios de riqueza entre las muestras basales y de la primera evaluación de respuesta. Supervivencia libre de progresión (SLP; A) y supervivencia global (SG; B) estratificadas en aumento ($n= 11$) vs. disminución ($n= 8$) de la riqueza. P valores obtenidos en el test de log-rango. Los pacientes se categorizaron de acuerdo con el cambio del valor de la riqueza entre pretratamiento y la primera evaluación de respuesta en grupos “aumento” y “disminución”.

Con los resultados previos, se procedió a evaluar si el aumento de la riqueza estaba relacionado con el aumento del recuento de linfocitos periféricos. En los 11 pacientes cuya riqueza aumentó durante el tratamiento, identificamos 6 pacientes (P2, P8, P9, P11, P16 y P17) con un aumento del recuento de linfocitos en sangre periférica; sin embargo, hubo otros 5 pacientes (P5, P6, P10, P15 y P19) que demostraron una disminución del recuento de linfocitos. Además, el análisis de Spearman mostró que no había una correlación significativa entre los cambios en el recuento de linfocitos periféricos y los cambios en la riqueza de TCR (Figura 47).

Nuestros resultados sugieren que el aumento en la riqueza de TCR- β en sangre periférica puede reflejar un efecto farmacológico de la terapia con anticuerpos anti-PD-1. Consistente con nuestros hallazgos, estudios previos en melanoma han demostrado que la terapia con ICBs aumenta la amplitud de TCR- β en sangre periférica, reflejándose en el número de clones únicos de TCR (Cha et al., 2014; Robert et al., 2014). Como consecuencia, este repertorio ampliado podría ofrecer más oportunidades para reconocer neoantígenos

tumorales, lo que conduce a mejores respuestas terapéuticas. Sin embargo, estos hallazgos deben ser validados en cohortes más amplias de pacientes en estudios futuros.

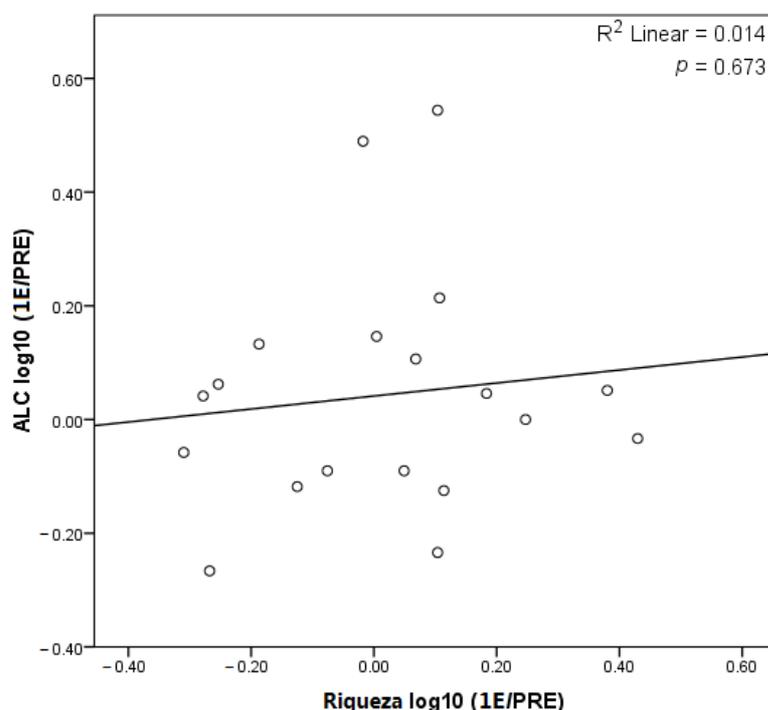


Figura 47. Correlaciones entre cambios en el recuento absoluto de linfocitos (ALC) y cambios en la riqueza de TCR entre las muestras basales y de la primera evaluación de respuesta. El eje X corresponde al \log_{10} ratio riqueza (1E/PRE), y el eje Y corresponde al \log_{10} ratio ALC (1E/PRE). Cada punto representa a un paciente. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de rango de Spearman. PRE: pretratamiento; 1E: primera evaluación de respuesta.

En cuanto al índice de equidad, no había asociaciones significativas entre su dinámica con la respuesta o supervivencia. Sin embargo, los pacientes con BCD exhibieron una tendencia a disminuir la equidad luego del tratamiento en comparación con los no BCD (Figura 45 B). Debido a que cuanto menor es la equidad, mayor es la clonalidad, los BCD mostraron un aumento de expansión clonal después del tratamiento con anti-PD-1, observaciones que concuerdan parcialmente con un estudio previo en pacientes con CPNM avanzado tratados con ICBs, donde se reportó que una expansión periférica entre la semana 4 y la semana 8 de los clones detectados en el tumor previo al tratamiento se correlacionó con una mejor respuesta a la inmunoterapia (Anagnostou et al., 2019). Además, al aislar linfocitos CD8+PD1+ de sangre periférica de los pacientes con CPNM avanzado tratados con anti-PD-1/anti-PD-L1, Han et al. han observado que el aumento de clonalidad de TCR- β se

asocia con una mayor reducción del tamaño tumoral y una SLP más prolongada (Han et al., 2020).

Aunque la convergencia no se asoció con variables pronósticas en el presente estudio, se identificaron cuatro pacientes que presentaron comportamientos muy diferentes respecto a la presencia de clonotipos convergentes (Figura 44 C). Por un lado, el paciente P8 presentó la reducción más grande en la cohorte, desde 0,2192 en muestra PRE hasta 0,0726 en muestra 1E. La disminución de la convergencia en este paciente se ve reflejada en la disminución de las frecuencias de algunas secuencias a nivel de aminoácidos, como ATSRETGKETQY, ASSLASGITGELF y ASSSSQGGNEQF, que son codificados cada uno por dos secuencias CDR3 NT diferentes con el mismo segmento V (Tabla 24). Cabe remarcar que el paciente P8 tuvo una SLP de tan solo 2,8 meses.

Tabla 24. Clonotipos convergentes del paciente P8.

TRBV	TRBJ	CDR3 AA	CDR3 NT	Frecuencia PRE (%)	Frecuencia 1E (%)
TRBV15	TRBJ2-5	ATSRETGKETQY	GCCACCAGCAGAGAACTGGAAAGAGACCCAGTAC	18,15	6,10
			GCCACCAGCAGAGACAGGGAAGAGACCCAGTAC	1,60	0,80
TRBV5-1	TRBJ2-2	ASSLASGITGELF	GCCAGCAGCTTGGCTAGCGGGATCACCGGGAGCTGTTT	0,43	6,62x10 ⁻³
			GCCAGCAGCTTGGCTCAGGGATCACCGGGAGCTGTTT	5,88x10 ⁻²	1,64x10 ⁻³
TRBV7-9	TRBJ2-1	ASSSSQGGNEQF	GCCAGCAGCTCTCCAGGGGGTAATGAGCAGTTC	5,26x10 ⁻²	9,90 x10 ⁻³
			GCCAGCAGCTCAAGCCAGGGCGGGAATGAGCAGTTC	3,81x10 ⁻²	5,07 x10 ⁻³

En la secuencia de CDR3 NT se marcan con color azul las bases correspondientes al segmento V y en verde las del segmento J. Las bases que han cambiado están en color rojo. PRE: pretratamiento; 1E: primera evaluación de respuesta; AA: secuencia aminoacídica; NT: secuencia nucleotídica.

Por otro lado, en 3 casos (P2, P9 y P15) se observó un llamativo aumento de convergencia cuando se comparaba la muestra PRE con la 1E. Estos pacientes P2, P9 y P15 presentaron respuesta parcial en la evaluación a los 6 meses después del inicio de tratamiento con anti-PD-1. En la Tabla 25 mostramos algunos ejemplos de clonotipos con secuencias CDR3 AA idénticas con la presencia del mismo segmento V pero que difieren en el nivel de secuencias nucleótidos para estos tres pacientes. Se detectó la aparición de unas secuencias de CDR3 NT nuevas en muestras obtenidas en 1E, además de aumentar la frecuencia del CDR3 NT existente.

Tabla 25. Clonotipos convergentes de los pacientes P2, P9 y P15.

TRBV	TRBJ	CDR3 AA	CDR3 NT	Frecuencia PRE (%)	Frecuencia 1E (%)
P2					
TRBV10-3	TRBJ2-1	AISLGNEQF	GCCATCTCCTTGGGCAATGAGCAGTTC	1,20	3,42
			GCCATCAGCCTAGGCAATGAGCAGTTC	0	1,94x10 ⁻³
TRBV7-3	TRBJ2-5	ASSLIGETQY	GCCAGCAGCTTAATTGGAGAGACCCAGTAC	5,76x10 ⁻²	8,72x10 ⁻²
			GCCAGCAGCTTGATAGGGGAGACCCAGTAC	0	7,60x10 ⁻³
TRBV11-2	TRBJ2-5	ASSLNSQETQY	GCCAGCAGCTTGAACAGCCAAGAGACCCAGTAC	3,21x10 ⁻²	4,92x10 ⁻²
			GCCAGCAGCTTGAATTCGCAAGAGACCCAGTAC	2,05x10 ⁻³	3,24x10 ⁻³
			GCCAGCAGCTTAAACTCAAGAGACCCAGTAC	0	1,78x10 ⁻³
P9					
TRBV15	TRBJ2-5	ATSRDGTETQY	GCCACCAGCAGAGATGGGACAGAAGAGACCCAGTAC	0	5,14x10 ⁻²
			GCCACCAGCAGAGACGGCACGGAAGAGACCCAGTAC	0	5,53x10 ⁻³
TRBV20-1	TRBJ2-1	SAYPLAGTYNEQF	AGTGCTTACCCACTAGCGGGAACCTACAATGAGCAGTTC	0	2,79x10 ⁻²
			AGTGCTTACCCCTAGCGGGAACCTACAATGAGCAGTTC	0	2,70x10 ⁻³
TRBV27	TRBJ1-3	ASSFSGGNTIY	GCCAGCAGTTTTCGGTGGAACACCATATAT	7,32x10 ⁻³	2,59x10 ⁻²
			GCCAGCAGTTTCTAGGGGGAACACCATATAT	0	2,44x10 ⁻³
P15					
TRBV19	TRBJ2-1	ASSITSGSYNEQF	GCCAGTAGTATACTAGCGGTTCTACAATGAGCAGTTC	2,18x10 ⁻²	0,10
			GCCAGTAGTATTACTAGCGGAGCTACAATGAGCAGTTC	0	7,71x10 ⁻³
			GCCAGTAGTACTACTAGCGGCTCTACAATGAGCAGTTC	0	6,95x10 ⁻³
TRBV11-2	TRBJ2-2	ASSFSAGELF	GCCAGCAGCTTTCAGCCGGGAGCTGTTT	0	4,67x10 ⁻²
			GCCAGCAGCTTCTCCGGGGAGCTGTTT	0	5,93x10 ⁻³
TRBV6-1	TRBJ1-5	ASSPGGQPQH	GCCAGCAGTCCGGGGGGCAGCCAGCAT	1,47 x10 ⁻²	3,25x10 ⁻²
			GCCAGCAGTCCAGGGGTTCAGCCAGCAT	0	1,07x10 ⁻²
			GCCAGCAGCCGGGGGTTCAGCCAGCAT	0	1,19x10 ⁻³

En la secuencia de CDR3 NT se marcan con color azul las bases correspondientes al segmento V y en verde las del segmento J. Las bases que han cambiado están en color rojo. PRE: pretratamiento; 1E: primera evaluación de respuesta; AA: secuencia aminoacídica; NT: secuencia nucleotídica.

Hasta la fecha, hay pocos trabajos que evalúen las dinámicas de la convergencia de TCR durante la inmunoterapia en pacientes oncológicos. Como hemos mencionado anteriormente, la convergencia de TCR en sangre basal ha demostrado poder de discriminación entre pacientes (melanoma, adenocarcinoma de células claras o carcinoma de próstata) respondedores y no respondedores tratados con un inhibidor de CTLA-4 con buena especificidad y sensibilidad (Looney et al., 2020). Al comparar la convergencia sanguínea basal y la convergencia de las muestras sanguíneas recogidas entre semana 2 y 3 después del inicio de tratamiento con anti-CTLA-4, Cham et al. han demostrado que los pacientes con

melanoma tienen un mayor aumento de convergencia de TCR durante el tratamiento en comparación con los pacientes con cáncer de próstata metastásico (Cham et al., 2020); estos resultados podrían reflejar la alta carga neoantigénica observada en melanoma que ayudaría a la expansión de las células T específica de neoantígenos. En cuanto al repertorio de TCR en sangre periférica de los pacientes con CPNM en estadios IIIA resecables, Bermudez et al. han demostrado que no hay diferencias significativas de la convergencia entre pretratamiento y 3 ciclos después del inicio de tratamiento neoadyuvante con nivolumab más carboplatino (Bermudez et al., 2020). Debido a los resultados inconsistentes, se requieren más estudios sobre los clonotipos convergentes de TCR en tumores sólidos y su relación con la respuesta a inmunoterapia, sobre todo en cohortes grandes de pacientes. Aunque no se encontró una asociación significativa de la convergencia con las variables pronósticas al tratamiento de anti-PD-1 en nuestro estudio, debido probablemente a la limitación en el tamaño muestral, el análisis descriptivo de los clonotipos convergentes entre PRE y 1E de aquellos pacientes que mostraron una pérdida o ganancia marcada de la convergencia durante el tratamiento sugieren que los clonotipos convergentes probablemente se dirijan a antígenos asociados a tumores, que podría tener aplicación para detectar respuestas de células T a neoantígenos tumorales. Sin embargo, el fenotipo de tales células T convergentes específicas a los antígenos tumorales se debe estudiar con más profundidad y es un tema que desde el grupo de investigación donde se ha realizado este trabajo de tesis doctoral se piensa abordar en el futuro.

En general, se considera que PD-1 desempeña un papel crucial en la regulación de la tolerancia inmunitaria y la terapia de bloqueo del PD-1 puede reactivar los TILs preexistentes que son reactivos contra neoantígenos tumorales (Chen & Mellman, 2017). Sin embargo, como lo discutieron Yost et al., existe una evidencia creciente de que la respuesta inmune puede originarse más allá del microambiente tumoral y depender del reclutamiento de células T periféricas (Yost et al., 2021). Nuestros hallazgos apoyan este argumento, haciendo una contribución importante al campo de los biomarcadores relacionados con la inmunoterapia antitumoral.

5.2. ANÁLISIS DE CLONOTIPOS A NIVEL NUCLEOTÍDICO Y RESPUESTA

A continuación, se evaluó el grado de similitud de los clonotipos CDR3 NT entre las muestras pareadas PRE y 1E de los 19 pacientes tratados en primera línea con pembrolizumab en monoterapia. Para ello, se utilizó el índice de Jaccard, que toma valores entre 0 y 1, siendo el valor de 1 el que corresponde a la igualdad total de los clonotipos CDR3 NT entre estos dos momentos.

En comparación con los pacientes no BCD, los pacientes que presentaban BCD mostraron una tendencia hacia un mayor índice de Jaccard, es decir, una mayor proporción de secuencias CDR3 NT compartidas entre las muestras sanguíneas PRE y 1E ($p= 0,05$; Figura 48).

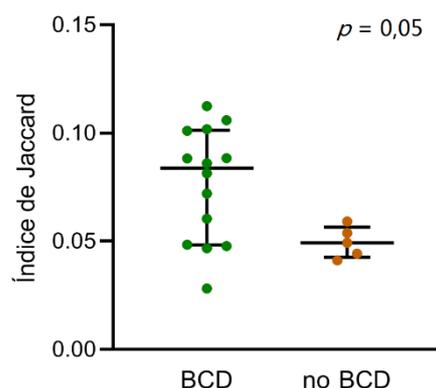


Figura 48. Correlación del índice de Jaccard entre las muestras basales y de la primera evaluación de respuesta con el beneficio clínico. *P* valor obtenido en la prueba *U* de Mann-Whitney. La línea central representa la mediana, mientras que las líneas superior e inferior muestran el rango intercuartil. Cada punto representa a un paciente (BCD: beneficio clínico duradero, en verde; no BCD: no beneficio clínico duradero, en naranja).

Posteriormente, el índice de Jaccard se utilizó para dicotomizar a los pacientes en subconjuntos de similitud "alta" y "baja", tomando como valor de corte la mediana (0,0605), 10 de 14 (71,4%) pacientes con BCD presentaron un índice de Jaccard por encima de la mediana, mientras que aquellos pacientes que no presentaban BCD presentaban valores por debajo de la mediana como se muestra en la Figura 49 ($p= 0,011$).

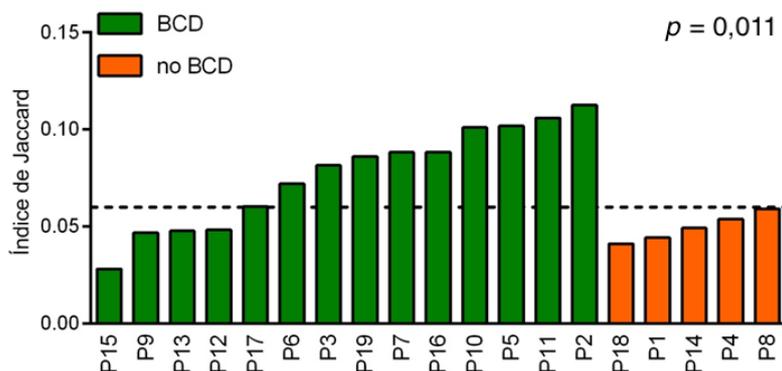


Figura 49. Índice de Jaccard entre las muestras basales y de la primera evaluación de respuesta según el beneficio clínico. P valor obtenido en la prueba exacta de Fisher. Cada columna representa a un paciente. BCD: beneficio clínico duradero, en verde; no BCD: no beneficio clínico duradero, en naranja.

Además, se evaluó el valor pronóstico del índice de similitud mediante el método de regresión univariante de Cox para SLP y SG (Tabla 26). El índice de Jaccard alto se asoció con un riesgo menor de progresión (HR= 0,183, 95%CI 0,037–0,921, $p= 0,039$).

Tabla 26. Análisis de Cox univariante basado en el índice de Jaccard entre las muestras basales y de la primera evaluación de respuesta.

Variable	SLP			SG		
	HR	95%CI	p valor	HR	95%CI	p valor
Índice de Jaccard Alto vs. bajo	0,183	0,037–0,921	0,039*	0,173	0,019–1,559	0,118

P valores obtenidos en el análisis de Cox univariante. Los valores del índice de Jaccard dicotomizados en “alto” y “bajo” tomando como punto de corte la mediana= 0,0605. SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global; HR: tasas de riesgo (*hazard ratio*); 95%CI: intervalo de confianza del 95% (*95% confidence interval*). * $p < 0,05$.

El método de Kaplan-Meier se realizó para obtener las curvas de supervivencia, indicando que los pacientes con mayor similitud de CDR3 NT entre PRE y 1E mostraron una mejor SLP (mediana no alcanzada vs. 3,27 meses, $p= 0,021$; Figura 50 A), observándose una tendencia en el mismo sentido en SG (medianas no alcanzadas, $p= 0,077$; Figura 50 B).

Asimismo, Liu et al. han demostrado que en CPNM tratados con quimioterapia, radioterapia o terapia dirigida una similitud más alta en los clones de TCR circulantes pre y post tratamiento se asocia con una SLP más larga en pacientes con CPNM avanzado (Y. Liu et al., 2019).

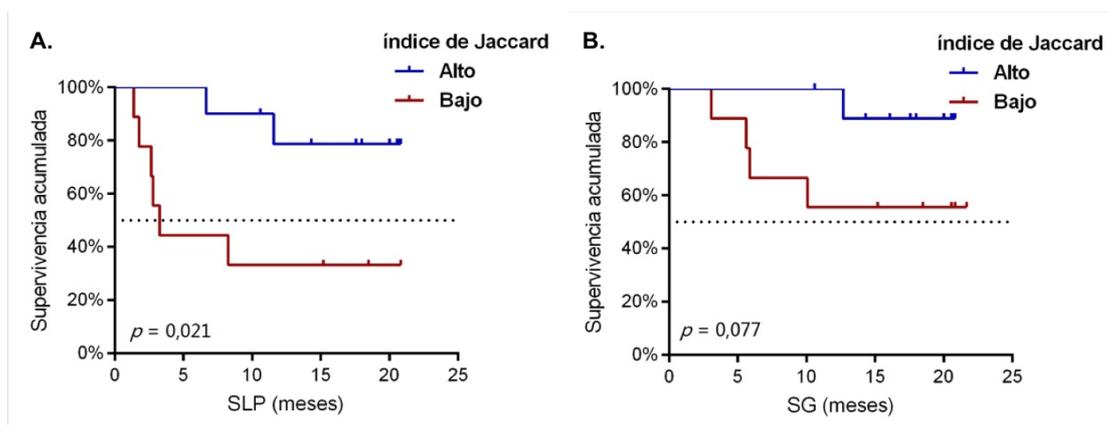


Figura 50. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier de acuerdo al índice de Jaccard entre las muestras basales y la primera evaluación de respuesta. A. Supervivencia libre de progresión (SLP). B. Supervivencia global (SG). P valores obtenidos en el test de log-rango. El índice de Jaccard se calculó como el número de clones compartidos dividido por el número total de clones en las muestras basales y la primera evaluación de respuesta del mismo sujeto y se utilizó la mediana= 0,0605 como valor de corte para definir grupos alto (línea azul) y bajo (línea roja).

Estos resultados, indicarían que las poblaciones de células T antitumorales preexistentes deberían mantenerse en sangre periférica durante el curso de tratamiento para llegar al microambiente tumoral y ejercer su función. Considerando que el aumento de la riqueza aporta valor pronóstico, nuestros datos también indican que además del mantenimiento de las poblaciones de células T, el repertorio ampliado de células T durante la inmunoterapia podría resultar en la activación de clones de células T específicos de neoantígenos adicionales, lo que hace que estos pacientes tengan mayor capacidad de responder a terapias con anti-PD-1.

5.3. ANÁLISIS DE LOS SEGMENTOS V y J DEL REPERTORIO TCR- β

Una vez realizados los análisis de las características generales del repertorio TCR, se hicieron las evaluaciones de los valores predictivos y pronósticos de la frecuencia de los reordenamientos V-J, así como los segmentos V y J. Recordando que la región CDR3 del TCR- β está involucrada en el reconocimiento de los antígenos y, por lo tanto, presenta la especificidad de la respuesta inmune antitumoral, estando sus extremos compuestos por el final del segmento V y el segmento J, respectivamente.

5.3.1. FRECUENCIAS DE REORDENAMIENTOS V-J

5.3.1.1. REORDENAMIENTOS V-J EN MUESTRAS BASALES

Dado que las secuencias que codifican los segmentos V, D y J son fundamentales para la generación de la diversidad de TCR, el siguiente paso en este trabajo de tesis doctoral consistió en el estudio de la presencia y frecuencias de diferentes reordenamientos que ocurren en la región CDR3 del TCR- β . Se identificaron un total de 706 reordenamientos V-J distintos en las 33 muestras sanguíneas basales. La Figura 51 muestra los 20 reordenamientos V-J más abundantes, usando el diagrama de Sankey, en el que la anchura de las flechas es proporcional a la frecuencia de cada reordenamiento. Entre ellos, los reordenamientos entre los segmentos TRBV20-1/TRBJ2-3 (1,17%), TRBV20-1/TRBJ2-5 (1,15%) y TRBV20-1/TRBJ1-2 (1,04%) fueron los más frecuentes en las muestras PRE analizadas.

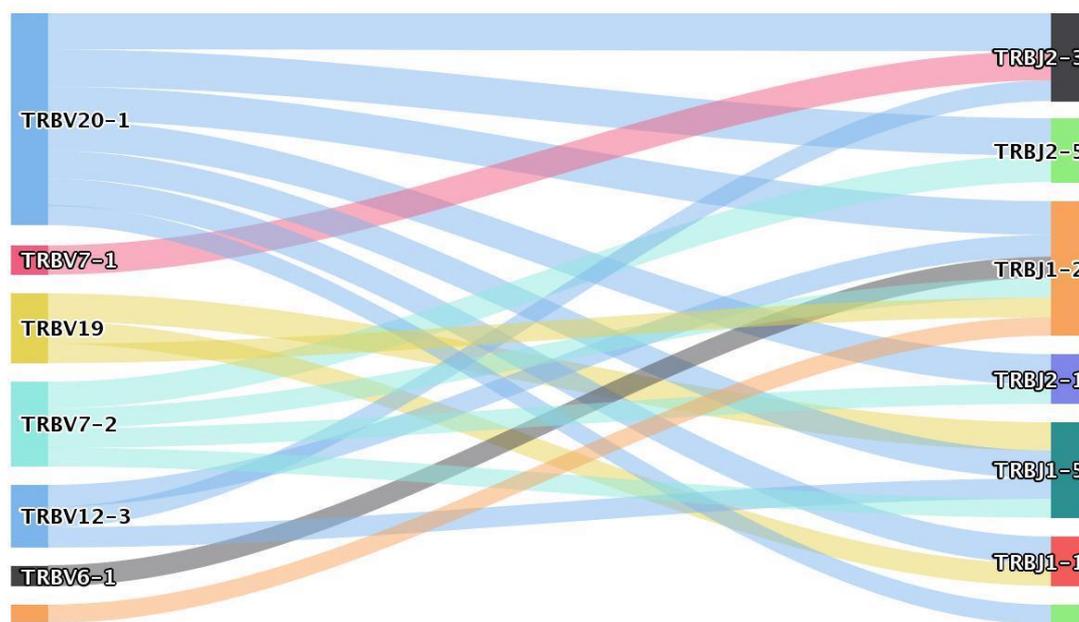


Figura 51. Diagrama de Sankey de los 20 reordenamientos V-J más abundantes en muestras basales. La anchura de las flechas es proporcional a la frecuencia de cada reordenamiento.

Al analizar la asociación de los 20 reordenamientos V-J PRE más abundantes con la respuesta al tratamiento, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

5.3.1.2. REORDENAMIENTOS V-J EN LA PRIMERA EVALUACIÓN DE RESPUESTA

Un total de 697 reordenamientos V-J distintos se obtuvieron en las 19 muestras recogidas a la primera evaluación de respuesta. Al igual que en las muestras basales, el segmento reordenado TRBV20-1/TRBJ2-3 fue el más frecuente (1,13%), seguido por TRBV20-1/TRBJ2-1 (1,11%) y TRBV20-1/TRBJ1-5 (1,07%) (Figura 52).

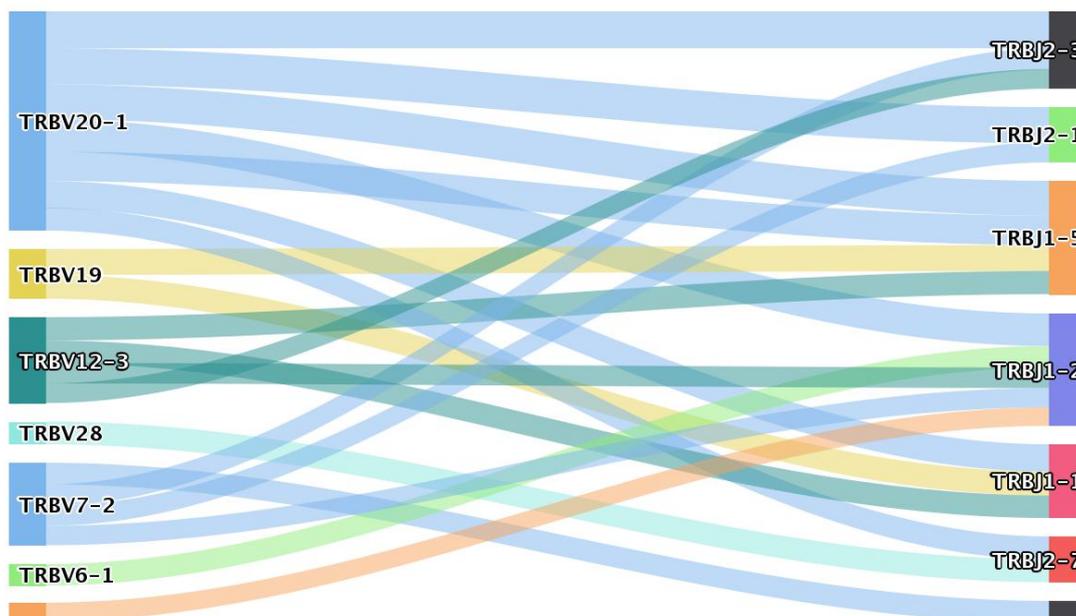


Figura 52. Diagrama de Sankey de los 20 reordenamientos V-J más abundantes en muestras de la primera evaluación de respuesta. La anchura de las flechas es proporcional a la frecuencia de cada reordenamiento.

Seguidamente se estudió la relación entre los 20 segmentos reordenados presentes en mayor frecuencia en la muestra 1E y el beneficio clínico, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos con y sin BCD. Hasta la fecha no hay estudios previos que evalúen la frecuencia de los reordenamientos de segmentos V y J en el momento inicial y durante el tratamiento en relación a la respuesta. Aunque no se observa asociación significativa entre los reordenamientos más abundantes con la respuesta a la inmunoterapia, nuestros datos indican que algunos clonotipos presentan un nivel superior en las muestras analizadas, a la vez que una mayor cantidad de clonotipos se conservan durante el tratamiento.

Mediante la secuenciación de TCR- β en muestras de tejido tumoral y normal, un estudio

previo analizó los reordenamientos de segmentos V y J en una cohorte de pacientes con cáncer de próstata observaron un grupo de reordenamientos V-J dominante y específico para los tejidos tumorales de próstata (Liu et al., 2018). En CPNM en estadios tempranos, Song et al. han observado que existe una buena separación entre las muestras de tejido tumoral y las muestras de tejido normal en cuanto a los 703 reordenamientos V-J, lo que indica que los patrones del reordenamiento de los segmentos génicos TRBV y TRBJ en los dos tipos de muestras son bastante diferentes y las células T que contienen ciertos reordenamientos V-J presentes en las muestras de tejido tumoral que son los responsables del reconocimiento de antígenos específicos de tumor a través de sus receptores (Z. Song et al., 2020).

Para estudiar mejor el repertorio de TCR circulante, a continuación, estudiamos la frecuencia a nivel individual de los segmentos V o J en las muestras PRE y 1E.

5.3.2. FRECUENCIAS DE SEGMENTOS V y J: VALOR PRONÓSTICO Y RELACIÓN CON RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Las lecturas obtenidas para las librerías PRE y 1E, identificaron 55 segmentos V y 13 segmentos J diferentes. Mediante el análisis de heatmap, se analizó la distribución de dichos segmentos entre muestras PRE y 1E, no mostrando diferencias llamativas entre las muestras PRE y 1E (Figura 53).

Como hemos mencionado anteriormente, la estimulación prolongada por antígenos específicos da lugar a un reordenamiento selectivo y una expansión clonal de linfocitos capaces de reconocer dichos antígenos. Estudios previos han confirmado el uso diferente de los genes TRBV y TRBJ en los linfocitos infiltrantes en varios tipos de tumores sólidos (Cui et al., 2018; Li et al., 2016; Y. Liu et al., 2019; Serana et al., 2009; Simon et al., 2018). Wang et al. han informado que el perfil de los segmentos V y J de los TCRs son diferentes en tejidos tumorales en comparación con tejidos normales adyacentes en el cáncer de pulmón (Wang et al., 2019). Sin embargo, al momento no existen trabajos que evalúen la frecuencia de cada uno de los segmentos pre y post tratamiento con relación a la respuesta de ICBs. En este estudio, analizamos exhaustivamente el uso de los genes TRBV y TRBJ en muestras

sanguíneas PRE y 1E, así como sus dinámicas durante la terapia con anti-PD-1.

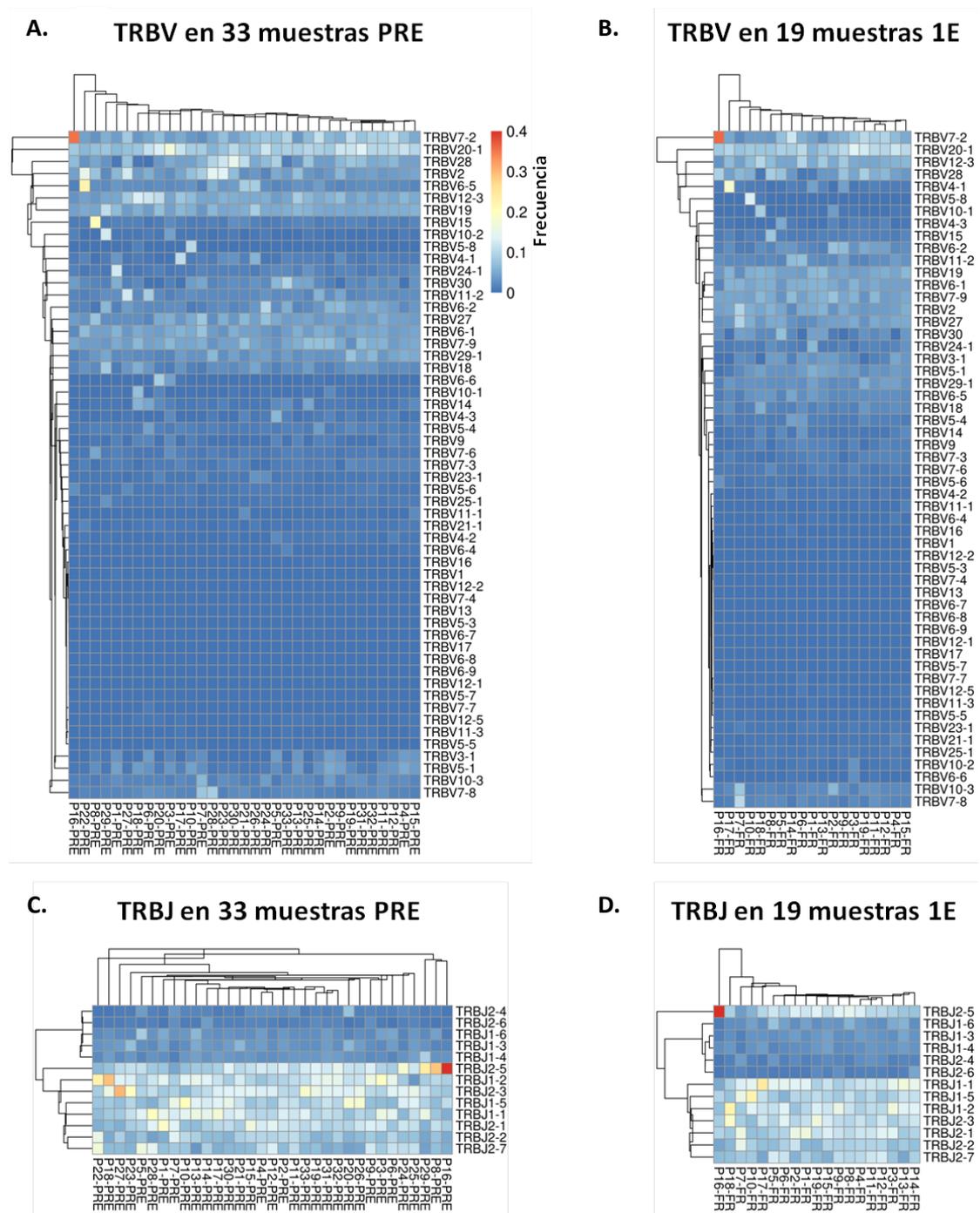


Figura 53. Segmentos V y J en muestras basales y la primera evaluación de respuesta. A. Frecuencia de TRBV en 33 muestras PRE. **B.** Frecuencia de TRBV en 19 muestras 1E. **C.** Frecuencia de TRBJ en 33 muestras PRE. **D.** Frecuencia de TRBJ en 19 muestras 1E. Las barras de color indican las frecuencias de genes TRBV o TRBJ de cada muestra. P: paciente; PRE: pretratamiento; 1E: primera evaluación de respuesta.

5.3.2.1. SEGMENTOS V y J EN MUESTRAS BASALES

Según las frecuencias de TRBV, los 3 segmentos V más abundantes en las muestras sanguíneas basales fueron TRBV20-1 (9,14%), TRBV7-2 (6,28%) y TRBV19 (5,19%) (Figura 54 A). Entre los segmentos J, TRBJ2-3 fue el más frecuente (13,17%; Figura 54 B).

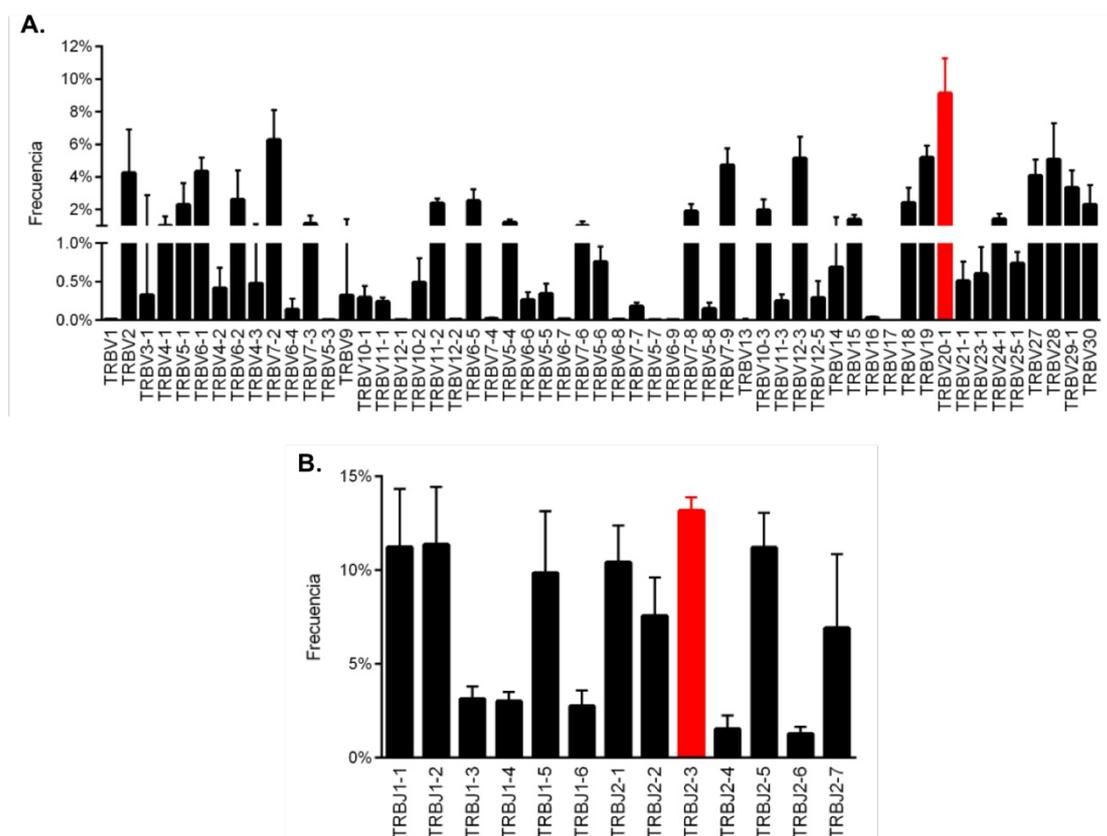


Figura 54. Frecuencias de segmentos V y J en muestras basales. A. TRBV. B. TRBJ. La altura de cada barra representa la mediana de la frecuencia, mientras que las barras de error muestran el rango intercuartil. Las barras de color rojo corresponden a los segmentos TRBV20-1 y TRBJ2-3 de mayor frecuencia.

Wang y sus colaboradores han demostrado previamente que entre los pacientes con cáncer de pulmón, el TRBV20-1 es el segmento más abundante en los clonotipos TCR residentes en tejido tumoral pero no en tejido pulmonar normal (Wang et al., 2019). Nuestros resultados están en concordancia con este estudio, aunque con la salvedad que en nuestro caso la detección ha sido en sangre periférica, e indicarían que los TCR conformados por TRBV20-1 podrían estar involucrados en el reconocimiento de algún/os neoantígeno/s específico de tumor.

A continuación, comparamos la frecuencia de clonotipos compuestos por un determinado segmento V o J con la respuesta al tratamiento. El análisis estadístico reveló 3 TRBV y 2 TRBJ que exhibieron diferencias significativas en BCD versus no BCD (Figura 55). TRBV6-5 fue más frecuente en no BCD ($p= 0,013$; Figura 55 A), mientras que TRBV20-1 y TRBV23-1 fueron más frecuentes en pacientes con BCD ($p= 0,027$ y $p= 0,043$; Figura 55 B, C). En cuanto a los segmentos J, TRBJ1-2 se encontró en frecuencias más altas en no BCD ($p= 0,047$; Figura 55 D), mientras que lo contrario ocurrió con TRBJ2-4 que se encontró más enriquecido en las muestras de pacientes con BCD ($p= 0,032$; Figura 55 E).

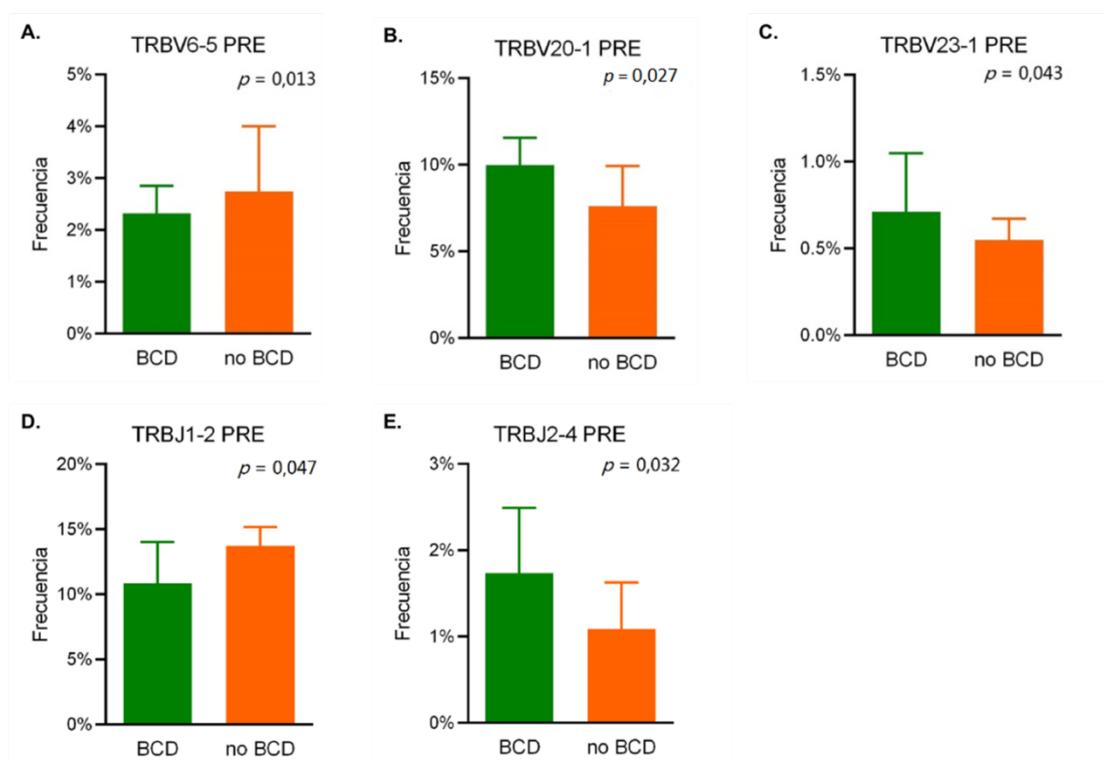


Figura 55. Correlación de frecuencias de segmentos V y J en muestras basales con el beneficio clínico. A. TRBV6-5 pretratamiento (PRE). B. TRBV20-1 PRE. C. TRBV23-1 PRE. D. TRBJ1-2 PRE. E. TRBJ2-4 PRE. *P* valores obtenidos en la prueba *U* de Mann-Whitney. La altura de cada barra representa la mediana de la frecuencia, mientras que las barras de error muestran el rango intercuartil.

Posteriormente, se evaluó el valor pronóstico de estos segmentos V y J mediante el uso del método de regresión univariante de Cox para SLP y SG. Las frecuencias de cada segmento fueron dicotomizadas de acuerdo con la mediana en grupos “alto” (\geq mediana) o “bajo” ($<$ mediana). Los resultados se muestran en la Tabla 27. El análisis reveló que los pacientes que presentaban frecuencias de TRBV6-5 altas tenían riesgo mayor de progresión (HR= 4,770,

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

95%CI 1,524–14,928, $p= 0,007$) y de muerte (HR= 7,678, 95%CI 1,662–35,458, $p= 0,009$); mientras que altas frecuencias de TRBV20-1 estaban relacionadas con una disminución en el riesgo de progresión (HR= 0,314, 95%CI 0,108–0,914, $p= 0,034$) y de muerte (HR= 0,268, 95%CI 0,072–0,995, $p= 0,049$).

Tabla 27. Análisis de Cox univariante basado en las frecuencias de segmentos V y J en muestras basales.

Variable	SLP			SG		
	HR	95%CI	p valor	HR	95%CI	p valor
TRBV6-5 PRE alto vs. bajo	4,770	1,524–14,928	0,007**	7,678	1,662–35,458	0,009**
TRBV20-1 PRE alto vs. bajo	0,314	0,108–0,914	0,034*	0,268	0,072–0,995	0,049*
TRBV23-1 PRE alto vs. bajo	0,632	0,234–1,704	0,364	0,365	0,109–1,221	0,102
TRBJ1-2 PRE alto vs. bajo	2,623	0,945–7,279	0,640	4,734	0,272–17,620	0,120
TRBJ2-4 PRE alto vs. bajo	0,447	0,161–1,242	0,122	0,378	0,113–1,266	0,115

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el método de regresión de Cox univariante. Las frecuencias de cada segmento dicotomizadas como “alto” y “bajo” tomando como punto de corte la mediana. PRE: pretratamiento; SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global; HR: tasas de riesgo (*hazard ratio*); 95%CI: intervalo de confianza del 95% (*95% confidence interval*). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

El método de Kaplan-Meier se realizó para obtener las curvas de supervivencia mostrando que los pacientes con altas frecuencias de TRBV6-5 tenían peor SLP (4,87 meses vs. mediana no alcanzada, $p= 0,003$; Figura 56 A) y SG (6,50 meses vs. mediana no alcanzada, $p= 0,002$; Figura 56 B). Sin embargo, pacientes con altos niveles de TRBV20-1 tenían una mejor SLP (mediana no alcanzada vs. 6,67 meses, $p= 0,025$; Figura 56 C) y SG (mediana no alcanzada vs. 12,70 meses, $p= 0,035$; Figura 56 D).

En cuanto a los segmentos J, no se registraron diferencias significativas en cuanto a su valor pronóstico.

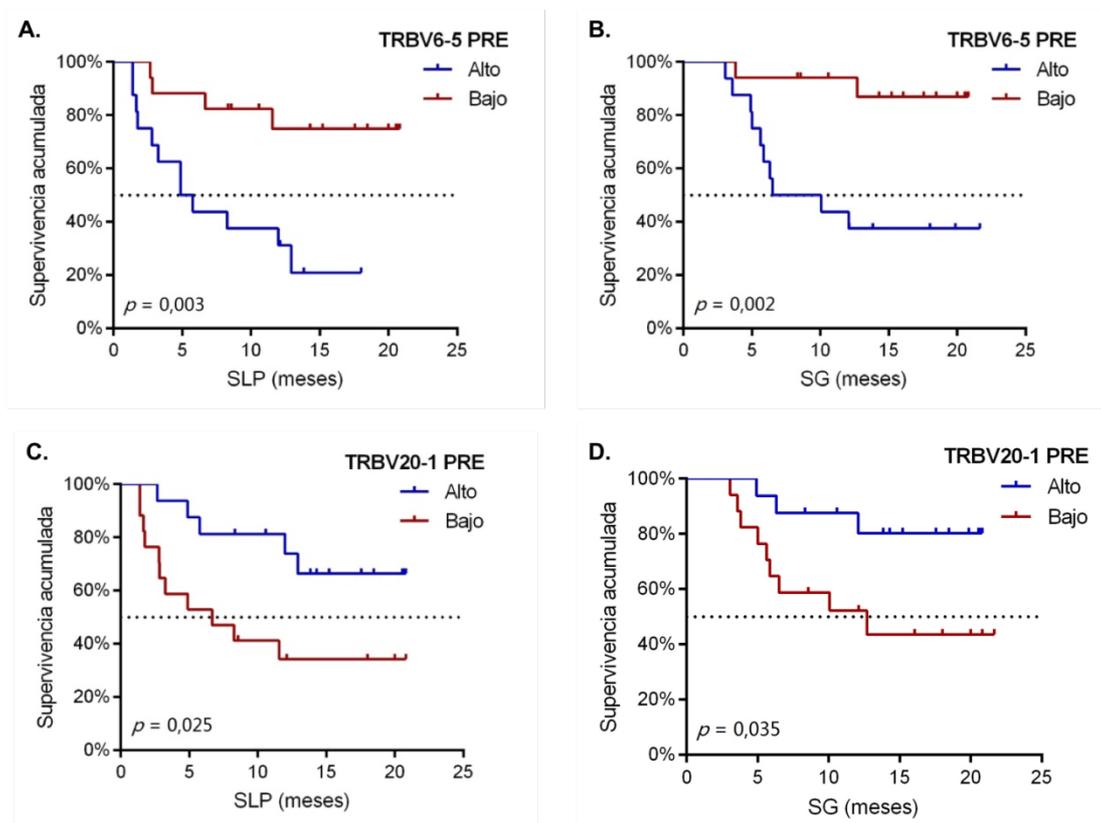


Figura 56. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier de acuerdo a las frecuencias de segmentos V en muestras basales. A-B. Supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG) de acuerdo a la frecuencia de TRBV6-5 pretratamiento (PRE). C-D. SLP y SG de acuerdo a la frecuencia de TRBV20-1 PRE. P valores obtenidos en el test de log-rango. Las frecuencias de los segmentos fueron dicotomizadas con respecto a la mediana en grupos alto (línea azul) y bajo (línea roja) (TRBV6-5 PRE, mediana= 2,53%; TRBV20-1 PRE, mediana= 9,14%).

Al momento existen pocos estudios que analicen el valor predictivo o pronóstico de los segmentos V y J en las células T circulantes y, según nuestro conocimiento, no se ha encontrado ninguno en el CPNM hasta la fecha. Nuestro estudio revela que TRBV6-5 se asocia con una peor respuesta y menor supervivencia. Una posible explicación del papel pronóstico negativo de este segmento puede ser que las células T que contienen este segmento no son activadas por antígenos asociados a tumores y no pueden reconocer neoantígenos. Esta hipótesis coincide con un estudio en cáncer de próstata, en el que TRBV6-5 es específico de las muestras del tejido normal y no se detectaron en el tejido tumoral (Liu et al., 2018). En cuanto al papel predictivo de los segmentos TRBV23-1, TRBJ1-2 y TRBJ2-4, al momento no existen datos en la literatura.

Por otra parte, nuestros resultados sugieren que TRBV20-1, el segmento V más

abundante, puede ser un biomarcador prometedor, cuya alta frecuencia en sangre periférica puede seleccionar a los pacientes con CPNM que obtienen beneficio al ser tratados con anti-PD-1. En línea con estos resultados, TRBV20-1 se ha informado anteriormente como uno de los segmentos V más frecuentes en los linfocitos infiltrantes en varios tumores sólidos, incluido el cáncer de pulmón (Li et al., 2016; Wang et al., 2019). Estos datos más nuestros resultados sugieren que entre las células T que contienen TRBV20-1 habría clonotipos capaces de reconocer neoantígenos tumorales específicos en cáncer de pulmón, y el análisis de este segmento en sangre periférica puede predecir una mejor respuesta a la inmunoterapia, tal y como hemos publicado recientemente (Dong et al., 2021).

5.3.2.2. SEGMENTOS V y J EN LA PRIMERA EVALUACIÓN DE RESPUESTA

Basando en los datos de secuenciación de las muestras 1E para los 19 pacientes tratados con pembrolizumab, TRBV20-1 (9,02%), TRBV7-2 (5,33%) y TRBV12-3 (5,31%) presentaron las frecuencias más altas entre los segmentos V (Figura 57 A), mientras que el TRBJ1-1 fue el segmento J más abundante (13,05%; Figura 57 B).

Al analizar el valor predictivo de los segmentos, observamos que TRBV6-4 y TRBV6-5 fueron más frecuentes en no BCD ($p= 0,033$ y $p= 0,010$, respectivamente; Figura 58 A, B), mientras que TRBV11-1 estuvo presente con mayor frecuencia en pacientes con BCD ($p= 0,033$; Figura 58 C). No se observan diferencias en cuanto a la frecuencia de diferentes segmentos J y el beneficio clínico.

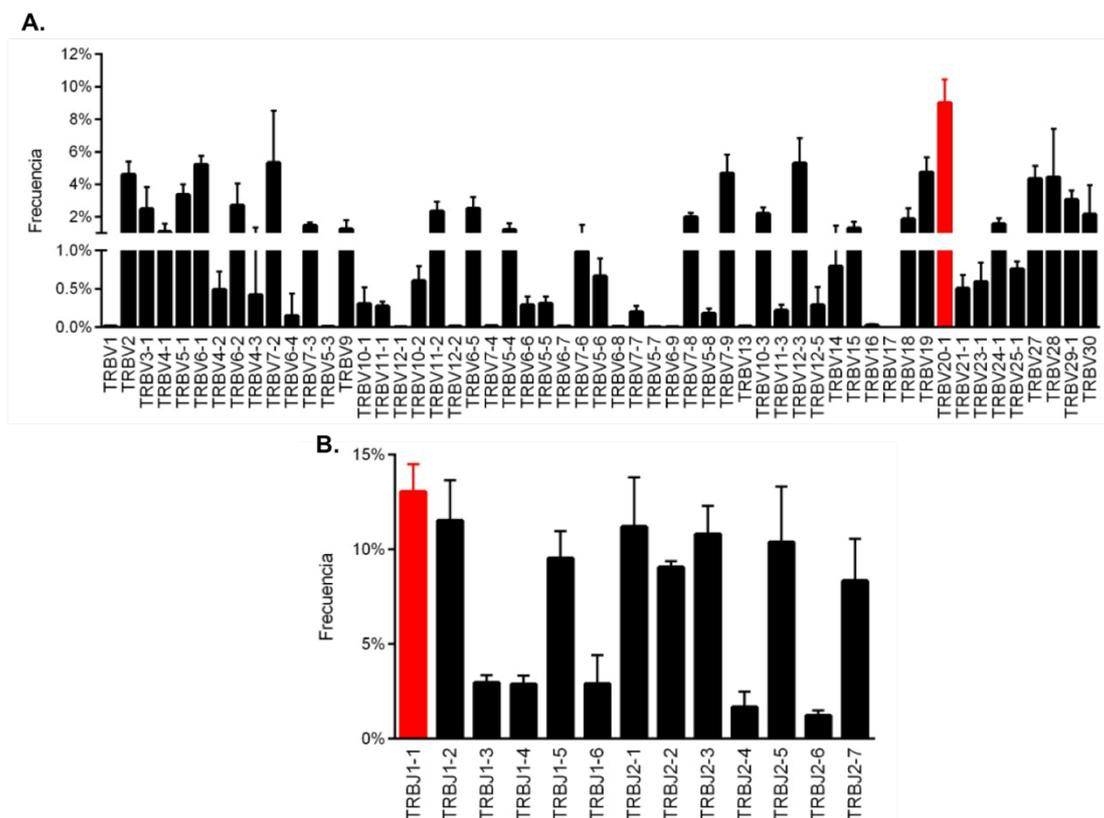


Figura 57. Frecuencias de segmentos V y J en muestras de primera evaluación de respuesta.

A. TRBV. B. TRBJ. La altura de cada barra representa la mediana de la frecuencia, mientras que las barras de error muestran el rango intercuartil. Las barras de color rojo corresponden a los segmentos TRBV20-1 y TRBJ1-1 de mayor frecuencia.

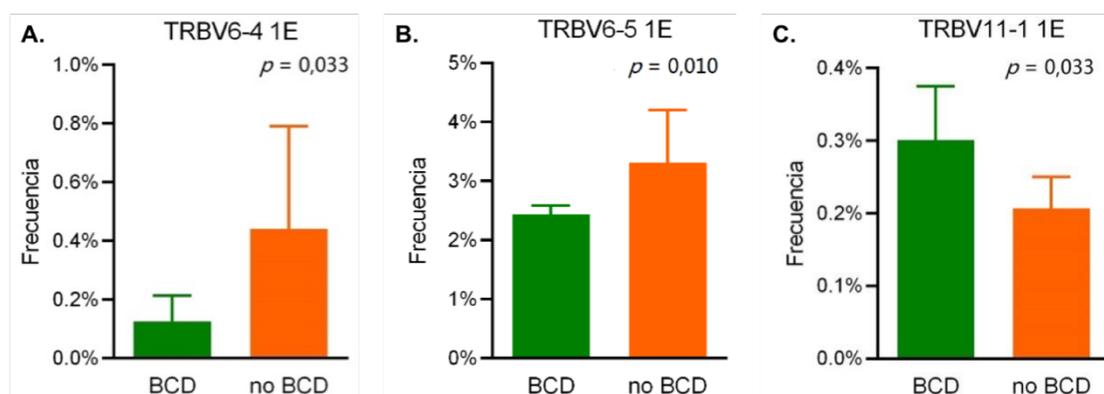


Figura 58. Correlación de frecuencias de segmentos V y J en muestras de la primera evaluación con el beneficio clínico. A. TRBV6-4 a la primera evaluación de respuesta (1E). B. TRBV6-5 1E. C. TRBV11-1 1E. *P* valores obtenidos en la prueba *U* de Mann-Whitney.

La altura de cada barra representa la mediana de la frecuencia, mientras que las barras de error muestran el rango intercuartil.

Además, se evaluó el valor pronóstico de estos segmentos mediante el método de regresión de Cox univariante (Tabla 28), no encontrándose diferencias significativas en cuanto a SLP y SG.

Tabla 28. Análisis de Cox univariante basado en las frecuencias de segmentos V en muestras de la primera evaluación de respuesta.

Variables	SLP			SG		
	HR	95%CI	p valor	HR	95%CI	p valor
TRBV6-4 1E alto vs. bajo	2,290	0,543–9,653	0,259	1,749	0,292–10,491	0,541
TRBV6-5 1E alto vs. bajo	2,560	0,605–10,836	0,201	6,249	0,688–56,782	0,104
TRBV11-1 1E alto vs. bajo	0,410	0,012–1,817	0,132	0,197	0,026–2,18	0,197

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el método de regresión de Cox univariante. Las frecuencias de cada segmento dicotomizadas como “alto” y “bajo” tomando como punto de corte la mediana. 1E: primera evaluación de respuesta; SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global; HR: tasas de riesgo (*hazard ratio*); 95%CI: intervalo de confianza del 95% (*95% confidence interval*).

Por otra parte, cabe remarcar que aunque no se observó asociación entre TRBV20-1 en muestras 1E con la respuesta, las frecuencias se mantuvieron en valores muy altos y siguió siendo el segmento más abundante tras el tratamiento con anti-PD-1. Cuando se analizaron las frecuencias de los clonotipos presentes con TRBV20-1 en muestras 1E con relación a la supervivencia, se encontró que una alta frecuencia de TRBV20-1 estaba relacionada con menor riesgo de progresión (HR= 0,117, 95%CI 0,014–0,955, $p= 0,045$) y de muerte (HR= 0,119, 95%CI 0,020–0,692, $p= 0,048$) (Tabla 29). Las curvas de supervivencia Kaplan-Meier se muestran en la Figura 59, indicando que los pacientes con altos niveles de TRBV20-1 en 1E presentaron una SLP más prolongada (mediana no alcanzada vs. 6,67 meses, $p= 0,016$; Figura 59 A) al igual que lo que ocurría con la SG (mediana no alcanzada vs. 17,19 meses, $p= 0,018$; Figura 59 B).

Tabla 29. Análisis de Cox univariante basado en la frecuencia de TRBV20-1 en primera evaluación de respuesta.

Variable	SLP			SG		
	HR	95%CI	p valor	HR	95%CI	p valor
TRBV20-1 1E alto vs. bajo	0,117	0,014–0,955	0,045*	0,119	0,020–0,692	0,048*

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el método de regresión de Cox univariante. Las frecuencias de TRBV20-1 1E dicotomizadas como “alto” y “bajo” tomando como punto de corte la mediana. 1E: primera evaluación de respuesta; SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global; HR: tasas de riesgo (*hazard ratio*); 95%CI: intervalo de confianza del 95% (*95% confidence interval*). * $p < 0,05$.

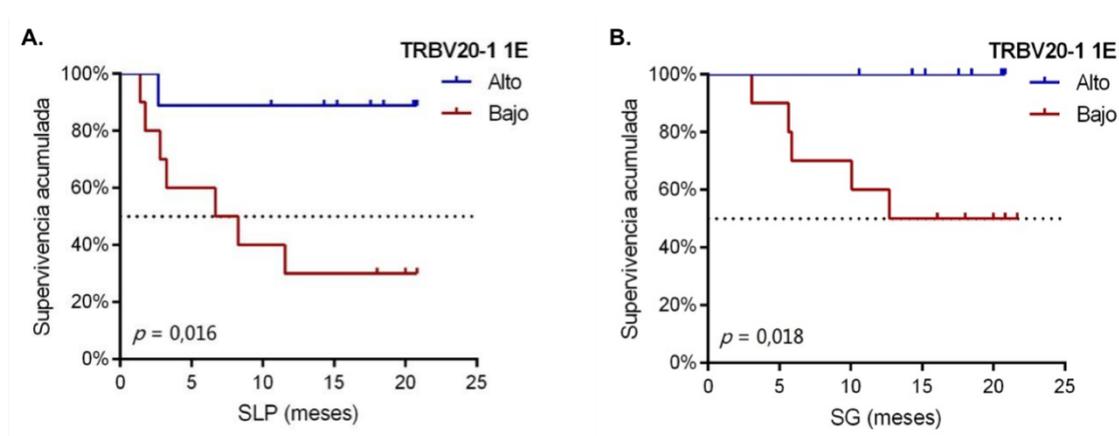


Figura 59. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier de acuerdo a las frecuencias de TRBV20-1 en muestras de la primera evaluación de respuesta. A. Supervivencia libre de progresión (SLP). B. Supervivencia global (SG). *P* valores obtenidos en el test de log-rango. Las frecuencias del TRBV20-1 fueron dicotomizadas con respecto a la mediana (9,02%) en grupos alto (línea azul) y bajo (línea roja). 1E: primera evaluación de respuesta.

De manera similar, mediante el análisis del repertorio de TCR de sangre periférica de pacientes con melanoma tratados con anti-CTLA-4, Cha et al. han demostrado que el mantenimiento de una alta frecuencia de ciertos clonotipos entre muestras pre y post tratamiento (un ciclo posterior del inicio de anti-CTLA-4) tiene un impacto positivo en los resultados clínicos (Cha et al., 2014). En la misma línea, en pacientes con CPNM tratados con bloqueantes del eje PD-1/PD-L1, se vio que una mayor conservación del uso de los 10 genes TRBV más abundantes en sangre periférica entre las muestras pretratamiento y las muestras 4-6 semanas posteriores al tratamiento está correlacionado con beneficio clínico (Han et al., 2020). Por lo tanto, considerando estos datos junto a nuestros resultados, proponemos que un alto nivel de TRBV20-1 en sangre basal y el mantenimiento de clones que contengan estos segmentos en frecuencias durante el tratamiento podría predecir una mejor respuesta y mayor supervivencia en pacientes con CPNM en estadios avanzados tratados con anti-PD-1.

5.3.2.3. DINÁMICA DE SEGMENTOS V y J

Al igual que como se hizo en apartados anteriores, el siguiente paso en nuestro estudio fue analizar de forma pareada las muestras PRE y 1E como una forma de visualizar la dinámica de los clonotipos durante el tratamiento con ICB. Los cambios de cada segmento (frecuencia 1E/PRE) se representaron en escala logarítmica (logaritmo en base 10). El log₁₀

del ratio de frecuencia $1E/PRE > 0$ indica que la frecuencia aumenta durante el tratamiento. Las dinámicas de frecuencias de segmentos V y J de TCR- β periféricos fueron de pequeña magnitud durante la inmunoterapia (Figura 60).

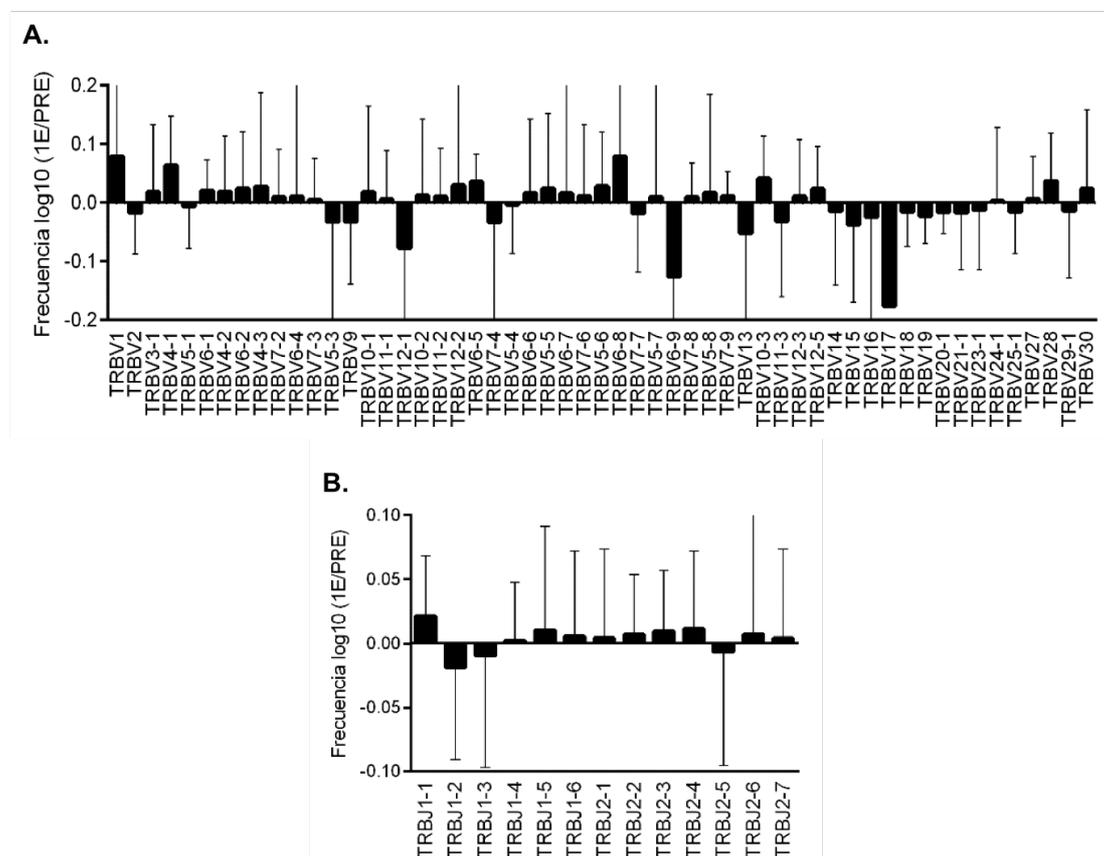


Figura 60. Cambios de frecuencias de los segmentos V y J entre las muestras basales y de la primera evaluación de respuesta. A. TRBV. B. TRBJ. El cambio de frecuencia de cada segmento entre las muestras basales (PRE) y la primera evaluación de respuesta (1E) se definió como el logaritmo de la ratio $1E/PRE$ en base 10 ($\log_{10}(1E/PRE)$), donde un $\log_{10}(1E/PRE)$ mayor que 0 representa un aumento de la frecuencia entre la muestra PRE y la 1E. La altura de cada barra representa la mediana de la frecuencia $\log_{10}(1E/PRE)$, mientras que las barras de error muestran el rango intercuartil.

Al analizar el cambio de clonotipos en base a su composición de segmentos V o J con relación a la respuesta al tratamiento mediante el uso de la prueba *U* de Mann-Whitney, se encontró que los clonotipos con segmentos TRBV6-4 y TRBJ2-2 disminuyeron en los pacientes con BCD, en comparación con los no BCD, en los que aumentaron ($p= 0,003$ y $p= 0,026$, respectivamente; Figura 61).

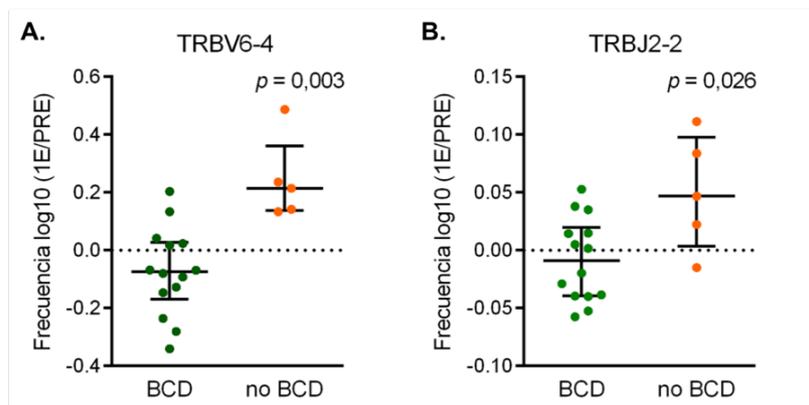


Figura 61. Dinámicas de frecuencias de segmentos V y J entre las muestras basales y de la primera evaluación de respuesta según el beneficio clínico. A. TRBV6-4. B. TRBJ2-2. Un $\log_{10}(1E/PRE) > 0$ representa el aumento y se indica por encima de la línea discontinua. *P* valores obtenidos en la prueba *U* de Mann-Whitney. La línea central representa la mediana, mientras que las líneas superior e inferior muestran el rango intercuartil. Cada punto representa a un paciente (BCD: beneficio clínico duradero, en verde; no BCD: no beneficio clínico duradero, en naranja). PRE: pretratamiento; 1E: primera evaluación de respuesta.

Al analizar el valor pronóstico del cambio de TRBV6-4 y TRBJ2-2 mediante el uso del método de regresión de Cox univariante, no se encontraron diferencias significativas en relación a la dinámica de estos segmentos (Tabla 30).

Tabla 30. Análisis de Cox univariante basado en las dinámicas de frecuencias de segmentos V y J entre las muestras basales y de la primera evaluación de respuesta.

Variables	SLP			SG		
	HR	95%CI	<i>p</i> valor	HR	95%CI	<i>p</i> valor
TRBV6-4 ↑ vs. ↓	4,053	0,811–20,254	0,088	4,496	0,501–40,377	0,180
TRBJ2-2 ↑ vs. ↓	1,531	0,364–6,439	0,561	3,522	0,393–31,598	0,261

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el método de regresión de Cox univariante. ↑: aumento. ↓: disminución; SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global; HR: tasas de riesgo (*hazard ratio*); 95%CI: intervalo de confianza del 95% (*95% confidence interval*).

Estudios previos han demostrado que los clonotipos de TILs más frecuentes fueron fácilmente identificados en la sangre en diferentes tipos de tumor sólido, incluso el cáncer de pulmón (Anagnostou et al., 2019; Huang et al., 2017; Snyder et al., 2017), indicando que los linfocitos pueden recircular entre el tumor y la circulación periférica. Un estudio reciente caracterizó de forma más exhaustiva la dinámica del repertorio en relación con el tratamiento con anti-PD-1 en CPNM en neoadyuvancia, demostrando que el 1% de los

clonotipos intratumorales más frecuentes también están presentes en la sangre periférica de los pacientes respondedores, mientras que esta asociación no se observa en los no respondedores (Zhang et al., 2020). Este hallazgo indica que los clonotipos de células T con mayor capacidad migratoria también influyen en la respuesta antitumoral.

Una nueva cuestión plantea este trabajo es si la respuesta inmune de las células T a ICBs se basa en la reactivación de los linfocitos infiltrantes intratumorales preexistentes o en el reclutamiento de células T desde la circulación periférica. Esta cuestión ha sido abordada por Yost et al., mediante la secuenciación de TCR en las muestras del tejido tumoral y las muestras sanguíneas, tanto pre como post tratamiento con anti-PD-1, en pacientes con carcinoma de células escamosas. Los autores han observado que un alto porcentaje de los clones de células T presentes en el tumor luego del tratamiento se derivan de clones que no se habían detectado en muestras tumorales previo al tratamiento, pero que sí se habían detectado en las muestras de sangre periférica, indicando que la expansión de las células T no se deriva de los TILs preexistentes, sino del reclutamiento de células T desde la circulación periférica (Yost et al., 2019).

En nuestro estudio, observamos que la frecuencia de clonotipos que contienen TRBV6-4 y TRBJ2-2 en sangre periférica disminuye cuando existe beneficio clínico al anti-PD-1. Considerando los hallazgos anteriores, se plantea una hipótesis que dichos clonotipos migrarían hacia el lecho tumoral desde la circulación con el fin de 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 y sus reordenamientos en sangre periférica basal y en el momento de la primera evaluación de respuesta al tratamiento, y su dinámica aportando evidencia relevante sobre ciertos clonotipos que pueden tener valor como posibles biomarcadores en el contexto de terapias bloqueantes del eje PD-1/PD-L1 en cáncer de pulmón avanzado. Sobre todo, una caracterización más exhaustiva de los clones que contienen el segmento TRBV20-1 sería de gran interés para identificar aquellos CDR3 capaces de reconocer neoantígenos específicos de CPNM.

6. INTEGRACIÓN DE LOS RESULTADOS

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral, se estudió en profundidad el repertorio TCR- β en sangre periférica de pacientes con CPNM en estadios avanzados tratados en primera línea con anti-PD-1 con el fin de analizar su utilidad como biomarcador en este escenario clínico, considerando las ventajas que ofrece la disponibilidad de muestras mínimamente invasivas en diferentes momentos de la evolución de la enfermedad. Un primer análisis llevado a cabo entre pacientes con CPNM y controles sanos revela que el repertorio de células T (determinado por secuenciación del CDR3 de la cadena β del TCR) difiere en cuanto a la riqueza y la frecuencia de uso de ciertos segmentos V en ambos grupos, reflejando las alteraciones que pueden encontrarse en el sistema inmunológico asociadas a esta patología oncológica.

El abordaje utilizado en este trabajo, basado en técnicas de secuenciación masiva ha permitido identificar características del repertorio inmune que pueden tener valor como biomarcador en el contexto de los tratamientos dirigidos al bloqueo del eje PD-1/PD-L1 y que se encuentran resumidos en la Figura 62. Nuestros resultados indican que un aumento de la riqueza y una mayor similitud de los clonotipos TCR en sangre periférica durante el tratamiento permiten distinguir a un grupo de pacientes que se benefician del tratamiento con anticuerpos bloqueantes de PD-1, sugiriendo que además del mantenimiento de las poblaciones de células T antitumorales preexistentes, el repertorio ampliado de linfocitos T podría resultar en la activación de clones de células T específicos para neoantígenos tumorales.

Por otro lado, hemos descrito la relevancia del estudio de las frecuencias de ciertos fragmentos génicos codificantes de la región V y J del TCR tales como TRBV6-4, TRBV6-5, TRBV20-1 y TRBJ2-2, en la predicción de respuesta y el pronóstico de los pacientes. Sobre todo, la alta frecuencia de clonotipos compuestos con TRBV20-1, tanto en sangre basal como a la primera evaluación, correlaciona con una respuesta favorable y un mejor pronóstico al tratamiento de pembrolizumab.

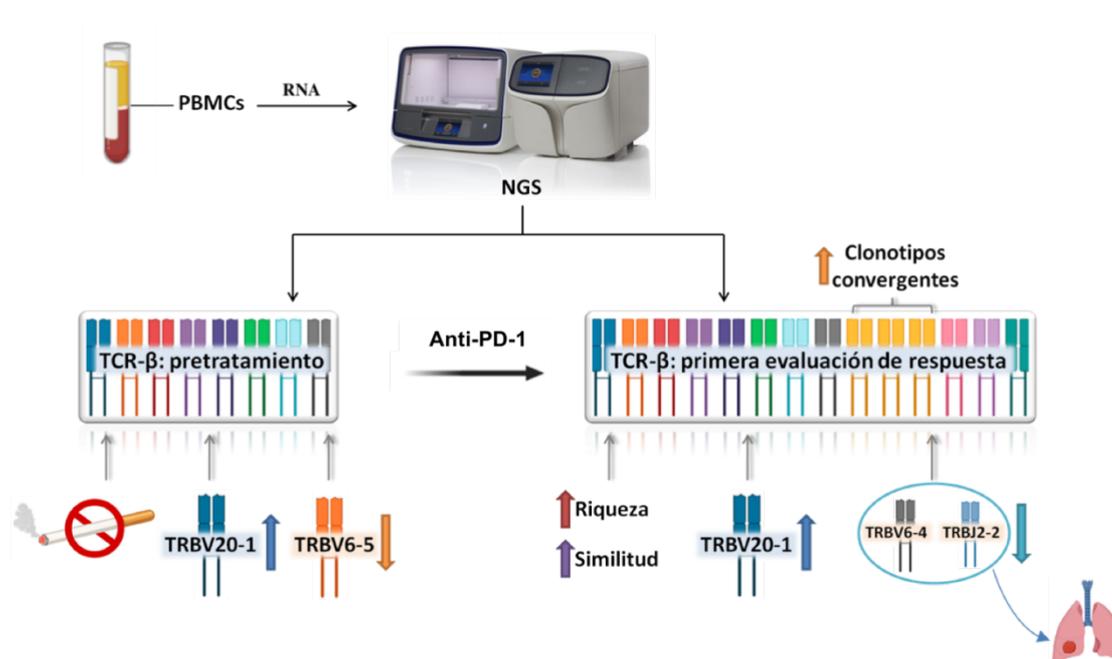


Figura 62. Características del repertorio de TCR-β en sangre periférica en una respuesta favorable al anti-PD-1.

La representación esquemática muestra las características favorables del repertorio de TCR-β en sangre periférica tanto pretratamiento como en la primera evaluación de respuesta (3 meses después del inicio de tratamiento) en relación al mejor curso clínico en pacientes con CPNM avanzado tratados con pembrolizumab.

Aunque existen algunas limitaciones en este estudio, principalmente relacionadas con el tamaño muestral que podrían condicionar la generalización de nuestros hallazgos y la falta del análisis comparativo entre muestras pareadas de sangre y tejido tumoral, los datos presentados muestran que la caracterización del repertorio de TCR en biopsia líquida proporciona una valiosa información clínica. La novedad de estos resultados que han sido publicados recientemente, abre posibles nuevas vías de investigación para la identificación de clones de linfocitos T capaces de reconocer neoantígenos específicos de cáncer de pulmón.

IV. CONCLUSIONES

1. La secuenciación de NGS es una técnica válida para estudiar el perfil de los linfocitos circulantes a través del análisis de la región CDR3 del TCR- β , logrando una buena caracterización del repertorio inmune mediante una aproximación mínimamente invasiva.
2. El repertorio de TCR- β en sangre periférica de pacientes con CPNM se puede distinguir claramente del repertorio de controles sanos en cuanto a la riqueza y la frecuencia de uso de segmentos génicos V, indicando un estado inmunológico diferencial asociado con el cáncer de pulmón.
3. El análisis de los indicadores que miden la diversidad y similitud del repertorio TCR revela que:
 - 3.1. El uso de los parámetros de riqueza, equidad, convergencia, y el índice de similitud de Jaccard, así como la composición de segmentos VDJ permite comparar de forma global las características del repertorio de células T, disminuyendo la complejidad de los análisis de los datos de secuenciación.
 - 3.2. La comparación de los índices que analizan el repertorio inmune entre muestras tomadas en diferentes momentos evolutivos indica que existen variaciones de la composición del repertorio durante el tratamiento con inmunoterapia.
4. Los análisis de la correlación con variables clínico-patológicas y pronósticas revelan que:
 - 4.1. Los pacientes fumadores presentan menor riqueza de TCR- β en sangre periférica sugiriendo un efecto negativo del hábito tabáquico sobre el sistema inmune.
 - 4.2. El aumento de la riqueza y una mayor similitud de los clonotipos TCR entre las muestras basales y las obtenidas en la primera evaluación de respuesta pueden identificar a un subgrupo de pacientes tratados con inhibidores de PD-1 que presentan un curso clínico más favorable.
5. El estudio de clonotipos a nivel individual revela que una frecuencia elevada de clonotipos que contengan el segmento TRBV20-1 en sangre periférica puede predecir una mejor respuesta a la inmunoterapia y aumento de supervivencia en nuestra cohorte de pacientes.

CONCLUSIONES

6. Una visión integral de los resultados permite posicionar al análisis del repertorio TCR- β como un posible nuevo biomarcador con valor pronóstico y predictivo en pacientes con CPNM avanzado tratados con bloqueantes del eje PD-1/PD-L1.

VI. REFERENCIAS

- Alifano, M., Mansuet-Lupo, A., Lococo, F., Roche, N., Bobbio, A., Canny, E., Schussler, O., Dermine, H., Régnard, J.-F., Burroni, B., Goc, J., Biton, J., Ouakrim, H., Cremer, I., Dieu-Nosjean, M.-C., & Damotte, D. (2014). Systemic inflammation, nutritional status and tumor immune microenvironment determine outcome of resected non-small cell lung cancer. *PloS One*, *9*(9), e106914. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106914>
- Altmann, D. M. (2018). A Nobel Prize-worthy pursuit: cancer immunology and harnessing immunity to tumour neoantigens. In *Immunology*, *155*(3), 283–284. <https://doi.org/10.1111/imm.13008>
- Anagnostou, V., Forde, P. M., White, J. R., Niknafs, N., Hruban, C., Naidoo, J., Marrone, K., Ashok Sivakumar, I. K., Bruhm, D. C., Rosner, S., Phallen, J., Leal, A., Adleff, V., Smith, K. N., Cottrell, T. R., Rhymee, L., Palsgrove, D. N., Hann, C. L., Levy, B., ... 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. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1127>
- 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. <https://doi.org/10.3390/ijms21072378>
- Bai, R., Lv, Z., Xu, D., & Cui, J. (2020). Predictive biomarkers for cancer immunotherapy with immune checkpoint inhibitors. *Biomarker Research*, *8*, 34. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00209-0>
- Barta, J. A., Powell, C. A., & Wisnivesky, J. P. (2019). Global epidemiology of lung cancer. *Annals of Global Health*, *85*(1), 8. <https://doi.org/10.5334/aogh.2419>
- Blandin Knight, S., Crosbie, P. A., Balata, H., Chudziak, J., Hussell, T., & Dive, C. (2017). Progress and prospects of early detection in lung cancer. *Open Biology*, *7*(9), 170070. <https://doi.org/10.1098/rsob.170070>
- Blank, C., Gajewski, T. F., & Mackensen, A. (2005). Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: Implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, *54*(4), 307–314. <https://doi.org/10.1007/s00262-004-0593-x>
- Brahmer, J. R., Rodríguez-Abreu, D., Robinson, A. G., Hui, R., Csósz, T., Fülöp, A., Gottfried, M., Peled, N., Tafreshi, A., Cuffe, S., O'Brien, M., Rao, S., Hotta, K., Zhang, J., Lubiniecki, G. M.,

REFERENCIAS

Deitz, A. C., Rangwala, R., & Reck, M. (2017). Health-related quality-of-life results for pembrolizumab versus chemotherapy in advanced, PD-L1-positive NSCLC (KEYNOTE-024): a multicentre, international, randomised, open-label phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, *18*(12), 1600–1609. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30690-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30690-3)

Brambilla, E., Le Teuff, G., Marguet, S., Lantuejoul, S., Dunant, A., Graziano, S., Pirker, R., Douillard, J. Y., Le Chevalier, T., Filipits, M., Rosell, R., Kratzke, R., Popper, H., Soria, J. C., Shepherd, F. A., Seymour, L., & Tsao, M. S. (2016). Prognostic effect of tumor lymphocytic infiltration in resectable non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *34*(11), 1223–1230. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.0970>

Bremnes, R. M., Dønnem, T., Al-Saad, S., Al-Shibli, K., Andersen, S., Sirera, R., Camps, C., Marinez, I., & Busund, L. T. (2011). The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: Emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, *6*(1), 209–217. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181f8a1bd>

Britanova, O. V., Putintseva, E. V., Shugay, M., Merzlyak, E. M., Turchaninova, M. A., Staroverov, D. B., Bolotin, D. A., Lukyanov, S., Bogdanova, E. A., Mamedov, I. Z., Lebedev, Y. B., & Chudakov, D. M. (2014). Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. *The Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *192*(6), 2689–2698. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302064>

Bubendorf, L., Lantuejoul, S., de Langen, A. J., & Thunnissen, E. (2017). Nonsmall cell lung carcinoma: diagnostic difficulties in small biopsies and cytological specimens: Number 2 in the Series "Pathology for the clinician" Edited by Peter Dorfmüller and Alberto Cavazza. *European Respiratory Review : an official journal of the European Respiratory Society*, *26*(144), 170007. <https://doi.org/10.1183/16000617.0007-2017>

Cha, E., Klinger, M., Hou, Y., Cummings, C., Ribas, A., Faham, M., & Fong, L. (2014). Improved survival with T cell clonotype stability after anti-CTLA-4 treatment in cancer patients. *Science Translational Medicine*, *6*(238), 238ra70. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008211>

Cham, J., Zhang, L., Kwek, S., Paciorek, A., He, T., Fong, G., Oh, D. Y., & Fong, L. (2020). Combination immunotherapy induces distinct T-cell repertoire responses when administered to patients with different malignancies. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, *8*(1), e000368. <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000368>

Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle.

Immunity, 39(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>

Chen, D. S., & Mellman, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*, 541(7637), 321–330. <https://doi.org/10.1038/nature21349>

Chen, Z., Fillmore, C. M., Hammerman, P. S., Kim, C. F., & Wong, K. K. (2014). Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nature Reviews. Cancer*, 14(8), 535–546. <https://doi.org/10.1038/nrc3775>

Chikuma, S. (2017). CTLA-4, an essential immune-checkpoint for T-cell activation. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 410, 99–126. https://doi.org/10.1007/82_2017_61

Cooper, M. D., & Alder, M. N. (2006). The evolution of adaptive immune systems. *Cell*, 124(4), 815–822. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.001>

Coulie, P. G., Van Den Eynde, B. J., 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. <https://doi.org/10.1038/nrc3670>

Couzin-Frankel, J. (2013). Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6165), 1432–1433. <https://doi.org/10.1126/science.342.6165.1432>

Cronkite, D. A., & Strutt, T. M. (2018). The regulation of inflammation by innate and adaptive lymphocytes. *Journal of Immunology Research*, 2018, 1467538. <https://doi.org/10.1155/2018/1467538>

Bermudez, C.A., Casarrubios, M., Laza Briviesca, R., Sierra-Rodero, B., Barquin, M., Romero, A., Franco, F., Calvo, V., Nadal, E., Insa, A., Garcia-Campelo, R., Casal, J., Domine, M., Massuti, B., Majem, M., Rodriguez-Abreu, D., Martinez-Marti, A., De Castro, J., & Provencio-Pulla, M. (2020). Peripheral blood T-cell receptor immune repertoire characterization of resectable stage IIIA non-small cell lung cancer patients receiving neo-adjuvant chemo-immunotherapy treatment from NADIM study. *Journal of Clinical Oncology*, 38(15_suppl), 9041–9041. https://doi.org/10.1200/jco.2020.38.15_suppl.9041

Cui, J. H., Lin, K. R., Yuan, S. H., Jin, Y. Bin, Chen, X. P., Su, X. K., Jiang, J., Pan, Y. M., Mao, S. L., Mao, X. F., & Luo, W. (2018). TCR repertoire as a novel indicator for immune monitoring and prognosis assessment of patients with cervical cancer. *Frontiers in Immunology*, 9, 2729. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02729>

de Bruin, E. C., McGranahan, N., Mitter, R., Salm, M., Wedge, D. C., Yates, L., Jamal-Hanjani, M., Shafi, S., Murugaesu, N., Rowan, A. J., Grönroos, E., Muhammad, M. A., Horswell, S.,

REFERENCIAS

- Gerlinger, M., Varela, I., Jones, D., Marshall, J., Voet, T., Van Loo, P., Rasmussen, D. M., ... Swanton, C. (2014). Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. *Science (New York, N.Y.)*, *346*(6206), 251–256. <https://doi.org/10.1126/science.1253462>
- De Simone, M., Rossetti, G., & Pagani, M. (2018). Single cell T cell receptor sequencing: Techniques and future challenges. In *Frontiers in Immunology*, *9*, 1638. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01638>
- Demaria, O., Cornen, S., Daëron, M., Morel, Y., Medzhitov, R., & Vivier, E. (2019). Harnessing innate immunity in cancer therapy. *Nature*, *574*(7776), 45–56. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1593-5>
- Detterbeck, F. C., Boffa, D. J., Kim, A. W., & Tanoue, L. T. (2017). The eighth edition lung cancer stage classification. *Chest*, *151*(1), 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.10.010>
- Dong, D., Zheng, L., Lin, J., Zhang, B., Zhu, Y., Li, N., Xie, S., Wang, Y., Gao, N., & Huang, Z. (2019). Structural basis of assembly of the human T cell receptor–CD3 complex. *Nature*, *573*(7775), 546–552. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1537-0>
- Dong, N., Moreno-Manuel, A., Calabuig-Fariñas, S., Gallach, S., Zhang, F., Blasco, A., Aparisi, F., Meri-Abad, M., Guijarro, R., Sirera, R., Camps, C., & Jantus-Lewintre, E. (2021). Characterization of circulating T cell receptor repertoire provides information about clinical outcome after PD-1 blockade in advanced non-small cell lung cancer patients. *Cancers*, *13*(12), 2950. <https://doi.org/10.3390/cancers13122950>
- Donnem, T., Kilvaer, T. K., Andersen, S., Richardsen, E., Paulsen, E. E., Hald, S. M., Al-Saad, S., Brustugun, O. T., Helland, A., Lund-Iversen, M., Solberg, S., Gronberg, B. H., Wahl, S. G., Helgeland, L., Flotten, O., Pohl, M., Al-Shibli, K., Sandanger, T. M., Pezzella, F., Busund, L. T., ... Bremnes, R. M. (2016). Strategies for clinical implementation of TNM-Immunoscore in resected nonsmall-cell lung cancer. *Annals of Oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, *27*(2), 225–232. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv560>
- Doroshov, D. B., Sanmamed, M. F., Hastings, K., Politi, K., Rimm, D. L., Chen, L., Melero, I., Schalper, K. A., & Herbst, R. S. (2019). Immunotherapy in non-small cell lung cancer: Facts and hopes. *Clinical Cancer Research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *25*(15), 4592–4602. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1538>
- Duan, Q., Zhang, H., Zheng, J., & Zhang, L. (2020). Turning cold into hot: firing up the tumor

microenvironment. *Trends in Cancer*, 6(7), 605–618.
<https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.02.022>

Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21(2), 137–148.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017>

Eisenhauer, E. A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L. H., Sargent, D., Ford, R., Dancey, J., Arbuck, S., Gwyther, S., Mooney, M., Rubinstein, L., Shankar, L., Dodd, L., Kaplan, R., Lacombe, D., & Verweij, J. (2009). New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 45(2), 228–247. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.10.026>

Faint, J. M., Pilling, D., Akbar, A. N., Kitas, G. D., Bacon, P. A., & Salmon, M. (1999). Quantitative flow cytometry for the analysis of T cell receptor V β chain expression. *Journal of Immunological Methods*, 225(1–2), 53–60.
[https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00027-7](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00027-7)

Fares, C. M., Van Allen, E. M., Drake, C. G., Allison, J. P., & Hu-Lieskovan, S. (2019). Mechanisms of resistance to immune checkpoint blockade: why does checkpoint inhibitor immunotherapy not work for all patients?. *American Society of Clinical Oncology Educational Book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*, 39, 147–164.
https://doi.org/10.1200/EDBK_240837

Feng, H., Shuda, M., Chang, Y., & Moore, P. S. (2008). Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5866), 1096–1100.
<https://doi.org/10.1126/science.1152586>

Ferguson, T. A., Choi, J., & Green, D. R. (2011). Armed response: how dying cells influence T-cell functions. *Immunological Reviews*, 241(1), 77–88.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01006.x>

Forde, P. M., Chaft, J. E., Smith, K. N., Anagnostou, V., Cottrell, T. R., Hellmann, M. D., Zahurak, M., Yang, S. C., Jones, D. R., Broderick, S., Battafarano, R. J., Velez, M. J., Rekhtman, N., Olah, Z., Naidoo, J., Marrone, K. A., Verde, F., Guo, H., Zhang, J., Caushi, J. X., ... Pardoll, D. M. (2018). Neoadjuvant PD-1 blockade in resectable lung cancer. *The New England journal of medicine*, 378(21), 1976–1986. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716078>

Franco, R., Martínez-Pinilla, E., Lanciego, J. L., & Navarro, G. (2016). Basic pharmacological and structural evidence for class A G-protein-coupled receptor heteromerization. *Frontiers in*

REFERENCIAS

Pharmacology, 7, 76. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00076>

Gajewski, T. F., Schreiber, H., & Fu, Y.-X. X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature immunology*, 14(10), 1014–1022. <https://doi.org/10.1038/ni.2703>

Galvano, A., Peri, M., Guarini, A. A., Castiglia, M., Grassadonia, A., De Tursi, M., Irtelli, L., Rizzo, S., Bertani, A., Gristina, V., Barraco, N., Russo, A., Natoli, C., & Bazan, V. (2020). Analysis of systemic inflammatory biomarkers in neuroendocrine carcinomas of the lung: prognostic and predictive significance of NLR, LDH, ALI, and LIPI score. *Therapeutic advances in medical oncology*, 12, 1758835920942378. <https://doi.org/10.1177/1758835920942378>

Gandhi, L., Rodríguez-Abreu, D., Gadgeel, S., Esteban, E., Felip, E., De Angelis, F., Domine, M., Clingan, P., Hochmair, M. J., Powell, S. F., Cheng, S. Y. S., Bischoff, H. G., Peled, N., Grossi, F., Jennens, R. R., Reck, M., Hui, R., Garon, E. B., Boyer, M., Rubio-Viqueira, B., ... KEYNOTE-189 Investigators (2018). Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*, 378(22), 2078–2092. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801005>

Gemine, R. E., Ghosal, R., Collier, G., Parry, D., Campbell, I., Davies, G., Davies, K., & Lewis, K. E. (2019). Longitudinal study to assess impact of smoking at diagnosis and quitting on 1-year survival for people with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 129, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.12.028>

Ghosh, C., Luong, G., & Sun, Y. (2021). A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway. *Journal of Cancer*, 12(9), 2735–2746. <https://doi.org/10.7150/JCA.57334>

Gibney, G. T., Weiner, L. M., & Atkins, M. B. (2016). Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *The Lancet. Oncology*, 17(12), e542–e551. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30406-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30406-5)

Glatzová, D., & Cebecauer, M. (2019). Dual role of CD4 in peripheral T lymphocytes. *Frontiers in Immunology*, 10, 618. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00618>

Goldstraw, P., Chansky, K., Crowley, J., Rami-Porta, R., Asamura, H., Eberhardt, W. E., Nicholson, A. G., Groome, P., Mitchell, A., Bolejack, V., Ball, International Association for the Study of Lung Cancer Staging and Prognostic Factors Committee, Advisory Boards, and Participating Institutions, & International Association for the Study of Lung Cancer Staging and Prognostic Factors Committee Advisory Boards and Participating Institutions (2016). The IASLC lung cancer staging project: proposals for revision of the TNM stage groupings in the

forthcoming (eighth) edition of the TNM classification for lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 11(1), 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2015.09.009>

Goodman, A. M., Kato, S., Bazhenova, L., Patel, S. P., Frampton, G. M., Miller, V., Stephens, P. J., Daniels, G. A., & Kurzrock, R. (2017). Tumor mutational burden as an independent predictor of response to immunotherapy in diverse cancers. *Molecular cancer therapeutics*, 16(11), 2598–2608. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0386>

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. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>

Greillier, L., Cortot, A. B., Viguier, J., Brignoli-Guibaudet, L., Lhomel, C., Eisinger, F., Morère, J. F., & Couraud, S. (2018). Perception of lung cancer risk: impact of smoking status and nicotine dependence. *Current Oncology Reports*, 20(Suppl 1), 18. <https://doi.org/10.1007/s11912-017-0650-1>

Grigg, C., & Rizvi, N. A. (2016). PD-L1 biomarker testing for non-small cell lung cancer: truth or fiction?. *Journal for immunotherapy of cancer*, 4, 48. <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0153-x>

Haanen, J. B. A. G., & Robert, C. (2015). Immune checkpoint inhibitors. *Progress in tumor research*, 42, 55–66. <https://doi.org/10.1159/000437178>

Hahn, W. C., & Weinberg, R. A. (2002). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nature reviews. Cancer*, 2(5), 331–341. <https://doi.org/10.1038/nrc795>

Han, J., Duan, J., Bai, H., Wang, Y., Wan, R., Wang, X., Chen, S., Tian, Y., Wang, D., Fei, K., Yao, Z., Wang, S., Lu, Z., Wang, Z., & 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. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0398>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Hassel, J. C., Heinzerling, L., Aberle, J., Bähr, O., Eigentler, T. K., Grimm, M. O., Grünwald, V.,

REFERENCIAS

Leipe, J., Reinmuth, N., Tietze, J. K., Trojan, J., Zimmer, L., & Gutzmer, R. (2017). Combined immune checkpoint blockade (anti-PD-1/anti-CTLA-4): Evaluation and management of adverse drug reactions. *Cancer treatment reviews*, *57*, 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.05.003>

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. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0116-x>

Hellmann, M. D., Callahan, M. K., Awad, M. M., Calvo, E., Ascierto, P. A., Atmaca, A., Rizvi, N. A., Hirsch, F. R., Selvaggi, G., Szustakowski, J. D., Sasson, A., Golhar, R., Vitzka, P., Chang, H., Geese, W. J., & Antonia, S. J. (2019). Tumor mutational burden and efficacy of nivolumab monotherapy and in combination with ipilimumab in small-cell lung cancer. *Cancer cell*, *33*(2), 329. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.04.001>

Henry, N. L., & Hayes, D. F. (2012). Cancer biomarkers. *Molecular oncology*, *6*(2), 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.01.010>

Herbst, R. S., Baas, P., Kim, D. W., Felip, E., Pérez-Gracia, J. L., Han, J. Y., Molina, J., Kim, J. H., Arvis, C. D., Ahn, M. J., Majem, M., Fidler, M. J., De Castro, G., Garrido, M., Lubiniecki, G. M., Shentu, Y., Im, E., Dolled-Filhart, M., & Garon, E. B. (2016). Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*, *387*(10027), 1540–1550. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01281-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01281-7)

Herbst, R. S., Morgensztern, D., & Boshoff, C. (2018). The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, *553*(7689), 446–454. <https://doi.org/10.1038/nature25183>

Hernandez, C. P., Morrow, K., Velasco, C., Wyczechowska, D. D., Naura, A. S., & Rodriguez, P. C. (2013). Effects of cigarette smoke extract on primary activated T cells. *Cellular Immunology*, *282*(1), 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.04.005>

Hinshaw, D. C., & Shevde, L. A. (2019). The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. *Cancer research*, *79*(18), 4557–4566. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3962>

Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., Akerley, W., van den Eertwegh, A. J. M., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbé, C.,

Peschel, C., ... Urban, W. J. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *New England journal of medicine*, 363(8), 711–723. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>

Hofman, P., Heeke, S., Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2019). Liquid biopsy in the era of immuno-oncology: is it ready for prime-time use for cancer patients?. *Annals of Oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 30(9), 1448–1459. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz196>

Hogan, S. A., Courtier, A., Cheng, P. F., Jaberg-Bentele, N. F., Goldinger, S. M., Manuel, M., Perez, S., Plantier, N., Mouret, J. F., Nguyen-Kim, T. D. L., Raaijmakers, M. I. G., Kvistborg, P., Pasqual, N., Haanen, J. B. A. G., Dummer, R., & Levesque, M. P. (2019). Peripheral blood TCR repertoire profiling may facilitate patient stratification for immunotherapy against melanoma. *Cancer immunology research*, 7(1), 77–85. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0136>

Huang, A. C., Postow, M. A., Orlowski, R. J., Mick, R., Bengsch, B., Manne, S., Xu, W., Harmon, S., Giles, J. R., Wenz, B., Adamow, M., Kuk, D., Panageas, K. S., Carrera, C., Wong, P., Quagliarello, F., Wubbenhorst, B., D'Andrea, K., Pauken, K. E., Herati, R. S., ... Wherry, E. J. (2017). T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature*, 545(7652), 60–65. <https://doi.org/10.1038/nature22079>

Huang, C., Zhu, H. X., Yao, Y., Bian, Z. H., Zheng, Y. J., Li, L., Moutsopoulos, H. M., Gershwin, M. E., & Lian, Z. X. (2019). Immune checkpoint molecules. Possible future therapeutic implications in autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity*, 104, 102333. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102333>

Iida, T., Ohno, H., Nakaseko, C., Sakuma, M., Takeda-Ezaki, M., Arase, H., Kominami, E., Fujisawa, T., & Saito, T. (2000). Regulation of cell surface expression of CTLA-4 by secretion of CTLA-4-containing lysosomes upon activation of CD4 + T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 165(9), 5062–5068. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.9.5062>

Janssen, L., Ramsay, E. E., Logsdon, C. D., & Overwijk, W. W. (2017). The immune system in cancer metastasis: friend or foe?. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 5(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0283-9>

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 inmunitarios con capacidad inmunomoduladora. Aplicabilidad terapéutica actual y futura. In M. Juan & R. Sirera (Eds.) *Inmunoterapia del cáncer*. (pp. 81–90). Elsevier España, S.L.U.

REFERENCIAS

- Jiang, T., Shi, T., Zhang, H., Hu, J., Song, Y., Wei, J., Ren, S., & Zhou, C. (2019). Tumor neoantigens: from basic research to clinical applications. *Journal of hematology & oncology*, *12*(1), 93. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0787-5>
- Karantanos, T., Karanika, S., Seth, B., & Gignac, G. (2019). The absolute lymphocyte count can predict the overall survival of patients with non-small cell lung cancer on nivolumab: a clinical study. *Clinical & Translational Oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, *21*(2), 206–212. <https://doi.org/10.1007/s12094-018-1908-2>
- Khunger, A., Rytlewski, J. A., Fields, P., Yusko, E. C., & Tarhini, A. A. (2019). The impact of CTLA-4 blockade and interferon- α on clonality of T-cell repertoire in the tumor microenvironment and peripheral blood of metastatic melanoma patients. *OncolImmunology*, *8*(11), e1652538. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1652538>
- Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, *121*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x>
- Kirsch, I., Vignali, M., & Robins, H. (2015). T-cell receptor profiling in cancer. *Molecular Oncology*, *9*(10), 2063–2070. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.09.003>
- Koh, J., Go, H., Keam, B., Kim, M.-Y., Nam, S. J., Kim, T. M., Lee, S.-H., Min, H. S., Kim, Y. T., Kim, D.-W., Jeon, Y. K., & Chung, D. H. (2015). Clinicopathologic analysis of programmed cell death-1 and programmed cell death-ligand 1 and 2 expressions in pulmonary adenocarcinoma: comparison with histology and driver oncogenic alteration status. *Modern Pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *28*(9), 1154–1166. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.63>
- Kuo, S. W., Chen, J. S., Huang, P. M., Hsu, H. H., Lai, H. S., & Lee, J. M. (2014). Prognostic significance of histologic differentiation, carcinoembryonic antigen value, and lymphovascular invasion in stage i non-small cell lung cancer. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, *148*(4), 1200-1207.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2014.04.038>
- Latimer, K. M. (2018). Lung cancer: clinical presentation and diagnosis. *FP Essentials*, *464*, 23–26.
- Le, D. T., Uram, J. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Kemberling, H., Eyring, A. D., Skora, A. D., Luber, B. S., Azad, N. S., Laheru, D., Biedrzycki, B., Donehower, R. C., Zaheer, A., Fisher, G. A., Crocenzi, T. S., Lee, J. J., Duffy, S. M., Goldberg, R. M., de la Chapelle, A., Koshiji, M., ... Diaz, L.

- A., Jr (2015). PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *The New England journal of medicine*, 372(26), 2509–2520. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1500596>
- Li, B., Li, T., Pignon, J. C., Wang, B., Wang, J., Shukla, S. A., Dou, R., Chen, Q., Hodi, F. S., Choueiri, T. K., Wu, C., Hacohen, N., Signoretti, S., Liu, J. S., & Liu, X. S. (2016). Landscape of tumor-infiltrating T cell repertoire of human cancers. *Nature genetics*, 48(7), 725–732. <https://doi.org/10.1038/ng.3581>
- Liu, S., Pan, W., Cheng, Z., Sun, G., Zhu, P., Chan, F., Hu, Y., Zhang, X., & Dai, Y. (2018). Characterization of the T-cell receptor repertoire by deep T cell receptor sequencing in tissues from patients with prostate cancer. *Oncology letters*, 15(2), 1744–1752. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7479>
- Liu, X., Cui, Y., Zhang, Y., Liu, Z., Zhang, Q., Wu, W., Zheng, Z., Li, S., Zhang, Z., & Li, Y. (2019). A comprehensive study of immunology repertoires in both preoperative stage and postoperative stage in patients with colorectal cancer. *Molecular genetics & genomic medicine*, 7(3), e504. <https://doi.org/10.1002/mgg3.504>
- Liu, Y., Yang, Q., Yang, J., Cao, R., Liang, J., Liu, Y., Zeng, Y., Chen, S., Xia, X., Zhang, K., & 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. <https://doi.org/10.1002/ijc.32145>
- Looney, T. J., Topacio-Hall, D., Lowman, G., Conroy, J., Morrison, C., Oh, D., Fong, L., & Zhang, L. (2020). TCR convergence in individuals treated with immune checkpoint inhibition for cancer. *Frontiers in Immunology*, 10, 2985. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02985>
- Lu, J., Van Laethem, F., Bhattacharya, A., Craveiro, M., Saba, I., Chu, J., Love, N. C., Tikhonova, A., Radaev, S., Sun, X., Ko, A., Arnon, T., Shifrut, E., Friedman, N., Weng, N. P., Singer, A., & Sun, P. D. (2019). Molecular constraints on CDR3 for thymic selection of MHC-restricted TCRs from a random pre-selection repertoire. *Nature communications*, 10(1), 1019. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08906-7>
- Lu, S., Stein, J. E., Rimm, D. L., Wang, D. W., Bell, J. M., Johnson, D. B., Sosman, J. A., Schalper, K. A., Anders, R. A., Wang, H., Hoyt, C., Pardoll, D. M., Danilova, L., & Taube, J. M. (2019). Comparison of biomarker modalities for predicting response to PD-1/PD-L1 checkpoint blockade: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Oncology*, 5(8), 1195–1204. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.1549>
- Ludwig, J. A., & Weinstein, J. N. (2005). Biomarkers in cancer staging, prognosis and

REFERENCIAS

- treatment selection. *Nature reviews. Cancer*, 5(11), 845–856. <https://doi.org/10.1038/nrc1739>
- Lyssiotis, C. A., & Kimmelman, A. C. (2017). Metabolic interactions in the tumor microenvironment. *Trends in cell biology*, 27(11), 863–875. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.06.003>
- Majem, M., Juan, O., Insa, A., Reguart, N., Trigo, J. M., Carcereny, E., García-Campelo, R., García, Y., Guirado, M., & Provencio, M. (2019). SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018). *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 21(1), 3–17. <https://doi.org/10.1007/s12094-018-1978-1>
- Mak, T. W., Saunders, M. E., & Jett, B. D. (2014). Chapter 8 - The T cell receptor: proteins and genes. In *Primer to the immune response (Second Edition)* (pp. 181–196). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385245-8.00008-X>
- Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C., & Boffetta, P. (2016). Risk factors for lung cancer worldwide. *The European respiratory journal*, 48(3), 889–902. <https://doi.org/10.1183/13993003.00359-2016>
- Mansilla-Soto, J., & Cortes, P. (2003). VDJ recombination: Artemis and its in vivo role in hairpin opening. *The Journal of experimental medicine*, 197(5), 543–547. <https://doi.org/10.1084/jem.20022210>
- Mantovani, A., Schioppa, T., Porta, C., Allavena, P., & Sica, A. (2006). Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer and metastasis reviews*, 25(3), 315–322. <https://doi.org/10.1007/s10555-006-9001-7>
- Marabelle, A., Fakih, M., Lopez, J., Shah, M., Shapira-Frommer, R., Nakagawa, K., Chung, H. C., Kindler, H. L., Lopez-Martin, J. A., Miller, W. H., Italiano, A., Kao, S., Piha-Paul, S. A., Delord, J.P., McWilliams, R. R., Fabrizio, D. A., Aurora-Garg, D., Xu, L., Jin, F., Norwood, K.,... Bang, Y.J. (2020). Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: prospective biomarker analysis of the multicohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study. *The Lancet. Oncology*, 21(10), 1353–1365. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30445-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30445-9)
- 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 : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 25(13),

3753–3758. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-4070>

Markowitz, S. B., Levin, S. M., Miller, A., & Morabia, A. (2013). Asbestos, asbestosis, smoking, and lung cancer. New findings from the North American insulator cohort. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *188*(1), 90–96. <https://doi.org/10.1164/rccm.201302-0257OC>

Matos, T. R., de Rie, M. A., & Teunissen, M. B. M. (2017). Research techniques made simple: high-throughput sequencing of the T-cell receptor. *The Journal of investigative dermatology*, *137*(6), e131–e138. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.04.001>

McGranahan, N., Furness, A. J. S., Rosenthal, R., Ramskov, S., Lyngaa, R., Saini, S. K., Jamal-Hanjani, M., Wilson, G. A., Birkbak, N. J., Hiley, C. T., Watkins, T. B. K., Shafi, S., Murugaesu, N., Mitter, R., Akarca, A. U., Linares, J., Marafioti, T., Henry, J. Y., Van Allen, E. M., Miao, D., ... Swanton, C. (2016). Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science (New York, N.Y.)*, *351*(6280), 1463–1469. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1490>

Merriman, B., Ion Torrent R&D Team, & Rothberg, J. M. (2012). Progress in Ion Torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis*, *33*(23), 3397–3417. <https://doi.org/10.1002/elps.201200424>

Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Berger, A., Bindea, G., Meatchi, T., Bruneval, P., Trajanoski, Z., Fridman, W.H., Pagès, F., & Galon, J. (2011). Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *29*(6), 610–618. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.5425>

Mocellin, S., & Nitti, D. (2013). CTLA-4 blockade and the renaissance of cancer immunotherapy. *Biochimica et biophysica acta*, *1836*(2), 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.05.003>

Motz, G. T., & Coukos, G. (2013). Deciphering and reversing tumor immune suppression. *Immunity*, *39*(1), 61–73. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.005>

Munn, D. H., & Bronte, V. (2016). Immune suppressive mechanisms in the tumor microenvironment. *Current Opinion in Immunology*, *39*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.10.009>

Nagai, S., & Azuma, M. (2019). The CD28–B7 family of co-signaling molecules. *Advances in experimental medicine and biology*, *1189*, 25–51.

REFERENCIAS

https://doi.org/10.1007/978-981-32-9717-3_2

Naidus, E., Bouquet, J., Oh, D. Y., Looney, T. J., Yang, H., Fong, L., Standifer, N. E., & Zhang, L. (2021). Early changes in the circulating T cells are associated with clinical outcomes after PD-L1 blockade by durvalumab in advanced NSCLC patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 70(7), 2095–2102. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02833-z>

Nobrega, A., Haury, M., Grandien, A., Malanchère, E., Sundblad, A., & Coutinho, A. (1993). Global analysis of antibody repertoires. II. Evidence for specificity, self-selection and the immunological “homunculus” of antibodies in normal serum. *European Journal of Immunology*, 23(11), 2851–2859. <https://doi.org/10.1002/eji.1830231119>

O’Keeffe, L. M., Taylor, G., Huxley, R. R., Mitchell, P., Woodward, M., & Peters, S. A. E. (2018). Smoking as a risk factor for lung cancer in women and men: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*, 8(10), e021611. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-021611>

Okazaki, T., & Honjo, T. (2007). PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *International immunology*, 19(7), 813–824. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxm057>

Osmani, L., Askin, F., Gabrielson, E., & Li, Q. K. (2018). Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy. *Seminars in cancer biology*, 52(Pt 1), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.11.019>

Ostroumov, D., Fekete-Drimusz, N., Saborowski, M., Kühnel, F., & Woller, N. (2018). CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 75(4), 689–713. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2686-7>

Pai-Scherf, L., Blumenthal, G. M., Li, H., Subramaniam, S., Mishra-Kalyani, P. S., He, K., Zhao, H., Yu, J., Paciga, M., Goldberg, K. B., McKee, A. E., Keegan, P., & Pazdur, R. (2017). FDA approval summary: pembrolizumab for treatment of metastatic non-small cell lung cancer: first-line therapy and beyond. *The Oncologist*, 22(11), 1392–1399. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0078>

Pakkala, S., & Ramalingam, S. S. (2018). Personalized therapy for lung cancer: striking a moving target. *JCI insight*, 3(15), e120858. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.120858>

Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer*, 12(4), 252–264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>

Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet (London, England)*,

357(9270), 1777–1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)

Paz-Ares, L., Luft, A., Vicente, D., Tafreshi, A., Gümüş, M., Mazières, J., Hermes, B., Çay Şenler, F., Csősz, T., Fülöp, A., Rodríguez-Cid, J., Wilson, J., Sugawara, S., Kato, T., Lee, K. H., Cheng, Y., Novello, S., Halmos, B., Li, X., Lubiniecki, G. M., ... KEYNOTE-407 Investigators (2018). Pembrolizumab plus chemotherapy for squamous non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*, 379(21), 2040–2051. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1810865>

Pereira, R., Oliveira, J., & Sousa, M. (2020). Bioinformatics and computational tools for next-generation sequencing analysis in clinical genetics. *Journal of clinical medicine*, 9(1), 132. <https://doi.org/10.3390/jcm9010132>

Pielou, E. C. (1966). Species-diversity and pattern-diversity in the study of ecological succession. *Journal of Theoretical Biology*, 10(2), 370–383. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(66\)90133-0](https://doi.org/10.1016/0022-5193(66)90133-0)

Planchard, D., Popat, S., Kerr, K., Novello, S., Smit, E. F., Faivre-Finn, C., Mok, T. S., Reck, M., Van Schil, P. E., Hellmann, M. D., & Peters, S., & ESMO Guidelines Committee (2018). Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 29(Suppl 4), iv192–iv237. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy275>

Postow, M. A., Manuel, M., Wong, P., Yuan, J., Dong, Z., Liu, C., Perez, S., Tanneau, I., Noel, M., Courtier, A., Pasqual, N., & 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, 23. <https://doi.org/10.1186/s40425-015-0070-4>

Principe, D. R., Chiec, L., Mohindra, N. A., & Munshi, H. G. (2021). Regulatory T-cells as an emerging barrier to immune checkpoint inhibition in lung cancer. *Frontiers in Oncology*, 11, 684098. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.684098>

Quandt, D., Zucht, H. D., Amann, A., Wulf-Goldenberg, A., Borrebaeck, C., Cannarile, M., Lambrechts, D., Oberacher, H., Garrett, J., Nayak, T., Kazinski, M., Massie, C., Schwarzenbach, H., Maio, M., Prins, R., Wendik, B., Hockett, R., Enderle, D., Noerholm, M., Hendriks, H., ... Seliger, B. (2017). Implementing liquid biopsies into clinical decision making for cancer immunotherapy. *Oncotarget*, 8(29), 48507–48520. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17397>

Reck, M., Rodríguez-Abreu, D., Robinson, A. G., Hui, R., Csősz, T., Fülöp, A., Gottfried, M., Peled, N., Tafreshi, A., Cuffe, S., O'Brien, M., Rao, S., Hotta, K., Leiby, M. A., Lubiniecki, G. M.,

REFERENCIAS

- Shentu, Y., Rangwala, R., Brahmer, J. R., & KEYNOTE-024 Investigators (2016). Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1–positive non–small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*, 375(19), 1823–1833. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606774>
- Reck, M., Rodríguez-Abreu, D., Robinson, A. G., Hui, R., Czoszi, T., Fülöp, A., Gottfried, M., Peled, N., Tafreshi, A., Cuffe, S., O'Brien, M., Rao, S., Hotta, K., Vandormael, K., Riccio, A., Yang, J., Catherine Pietanza, M., & Brahmer, J. R. (2019). Updated analysis of KEYNOTE-024: Pembrolizumab versus platinum-based chemotherapy for advanced non–small-cell lung cancer with PD-L1 tumor proportion score of 50% or greater. *Journal of Clinical Oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 37(7), 537–546. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.00149>
- Rempala, G. A., & Seweryn, M. (2013). Methods for diversity and overlap analysis in T-cell receptor populations. *Journal of Mathematical Biology*, 67(6–7), 1339–1368. <https://doi.org/10.1007/s00285-012-0589-7>
- Reuben, A., Gittelman, R., Gao, J., Zhang, J., Yusko, E. C., Wu, C.-J., Emerson, R., Zhang, J., Tipton, C., Li, J., Quek, K., Gopalakrishnan, V., Chen, R., Vence, L. M., Cascone, T., Vignali, M., Fujimoto, J., Rodriguez-Canales, J., Parra, E. R., Little, L. D., ... Zhang, J. (2017). TCR repertoire intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas: an association with predicted neoantigen heterogeneity and postsurgical recurrence. *Cancer Discovery*, 7(10), 1088–1097. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0256>
- Reuben, A., Zhang, J., Chiou, S. H., Gittelman, R. M., Li, J., Lee, W. C., Fujimoto, J., Behrens, C., Liu, X., Wang, F., Quek, K., Wang, C., Kheradmand, F., Chen, R., Chow, C. W., Lin, H., Bernatchez, C., Jalali, A., Hu, X., Wu, C. J., ... Zhang, J. (2020). Comprehensive T cell repertoire characterization of non-small cell lung cancer. *Nature Communications*, 11(1), 603. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14273-0>
- Riaz, N., Havel, J. J., Makarov, V., Desrichard, A., Urba, W. J., Sims, J. S., Hodi, F. S., Martín-Algarra, S., Mandal, R., Sharfman, W. H., Bhatia, S., Hwu, W.-J., Gajewski, T. F., Slingluff, C. L., Chowell, D., Kendall, S. M., Chang, H., Shah, R., Kuo, F., Morris, L., ... Chan, T. A. (2017). Tumor and microenvironment evolution during immunotherapy with nivolumab. *Cell*, 171(4), 934–949.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.028>
- Ribas, A. (2012). Tumor immunotherapy directed at PD-1. *The New England Journal of Medicine*, 366(26), 2517–2519. <https://doi.org/10.1056/NEJMe1205943>
- Riley, T. P., Hellman, L. M., Gee, M. H., Mendoza, J. L., Alonso, J. A., Foley, K. C., Nishimura, M.

- I., Vander Kooi, C. W., Garcia, K. C., & Baker, B. M. (2018). T cell receptor cross-reactivity expanded by dramatic peptide–MHC adaptability. *Nature Chemical Biology*, *14*(10), 934–942. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0130-4>
- Rizvi, N. A., Hellmann, M. D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J. J., Lee, W., Yuan, J., Wong, P., Ho, T. S., Miller, M. L., Rekhtman, N., Moreira, A. L., Ibrahim, F., Bruggeman, C., Gasmi, B., Zappasodi, R., Maeda, Y., Sander, C., Garon, E. B., ... Chan, T. A. (2015). Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science (New York, N.Y.)*, *348*(6230), 124–128. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1348>
- Robert, C. (2020). A decade of immune-checkpoint inhibitors in cancer therapy. *Nature communications*, *11*(1), 3801. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17670-y>
- Robert, L., Tsoi, J., Wang, X., Emerson, R., Homet, B., Chodon, T., Mok, S., Huang, R. R., Cochran, A. J., Comin-Anduix, B., Koya, R. C., Graeber, T. G., Robins, H., & Ribas, A. (2014). CTLA4 blockade broadens the peripheral T-cell receptor repertoire. *Clinical Cancer Research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *20*(9), 2424–2432. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2648>
- Robins, H. (2013). Immunosequencing: applications of immune repertoire deep sequencing. *Current Opinion in Immunology*, *25*(5), 646–652. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.09.017>
- Rooney, M. S., Shukla, S. A., Wu, C. J., Getz, G., & Hacohen, N. (2015). Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell*, *160*(1–2), 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.033>
- Roskoski, R. (2020). Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: a 2020 update. *Pharmacological Research*, *152*, 104609. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104609>
- Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J. H., Johnson, K., Milgrew, M. J., Edwards, M., Hoon, J., Simons, J. F., Marran, D., Myers, J. W., Davidson, J. F., Branting, A., Nobile, J. R., Puc, B. P., Light, D., Clark, T. A., ... Bustillo, J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, *475*(7356), 348–352. <https://doi.org/10.1038/nature10242>
- Rozenblum, A. B., Ilouze, M., Dudnik, E., Dvir, A., Soussan-Gutman, L., Geva, S., & Peled, N. (2017). Clinical impact of hybrid capture–based next-generation sequencing on changes in treatment decisions in lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, *12*(2), 258–268.

REFERENCIAS

<https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.10.021>

Sacher, A. G., & Gandhi, L. (2016). Biomarkers for the clinical use of PD-1/PD-L1 inhibitors in non-small-cell lung cancer: a review. *JAMA Oncology*, 2(9), 1217–1222. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.0639>

Sahai, E., Astsaturov, I., Cukierman, E., DeNardo, D. G., Egeblad, M., Evans, R. M., Fearon, D., Greten, F. R., Hingorani, S. R., Hunter, T., Hynes, R. O., Jain, R. K., Janowitz, T., Jorgensen, C., Kimmelman, A. C., Kolonin, M. G., Maki, R. G., Powers, R. S., Puré, E., Ramirez, D. C., ... Werb, Z. (2020). A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nature reviews. Cancer*, 20(3), 174–186. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0238-1>

Sasco, A. J., Secretan, M. B., & Straif, K. (2004). Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 45 Suppl 2, S3–S9. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2004.07.998>

Schalper, K. A., Brown, J., Carvajal-Hausdorf, D., McLaughlin, J., Velcheti, V., Syrigos, K. N., Herbst, R. S., & Rimm, D. L. (2015). Objective measurement and clinical significance of TILs in non-small cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(3), dju435. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju435>

Schneider, H., & Rudd, C. E. (2014). Diverse mechanisms regulate the surface expression of immunotherapeutic target CTLA-4. *Frontiers in Immunology*, 5, 619. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00619>

Schrama, D., Ritter, C., & Becker, J. C. (2017). T cell receptor repertoire usage in cancer as a surrogate marker for immune responses. *Seminars in immunopathology*, 39(3), 255–268. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0614-9>

Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6024), 1565–1570. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>

Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., & Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology*, 7, 3. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-3>

Schumacher, T. N., Scheper, W., & Kvistborg, P. (2019). Cancer neoantigens. *Annual review of immunology*, 37, 173–200. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053402>

- Schumacher, T. N., & Schreiber, R. D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science (New York, N.Y.)*, *348*(6230), 69–74. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4971>
- Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Cingarlini, S., Dolcetti, L., Gallina, G., Zanovello, P., & Bronte, V. (2004). Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells. *Cancer immunology, immunotherapy* : *CII*, *53*(2), 64–72. <https://doi.org/10.1007/s00262-003-0443-2>
- Serana, F., Sottini, A., Caimi, L., Palermo, B., Natali, P. G., Nisticò, P., & Imberti, L. (2009). Identification of a public CDR3 motif and a biased utilization of T-cell receptor V beta and J beta chains in HLA-A2/Melan-A-specific T-cell clonotypes of melanoma patients. *Journal of Translational Medicine*, *7*, 21. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-7-21>
- Sesma, A., Pardo, J., Cruellas, M., Gálvez, E. M., Gascón, M., Isla, D., Martínez-Lostao, L., Ocariz, M., Paño, J. R., Quílez, E., Ramírez, A., Torres-Ramón, I., Yubero, A., Zapata, M., & Lastra, R. (2020). From tumor mutational burden to blood T cell receptor: looking for the best predictive biomarker in lung cancer treated with immunotherapy. *Cancers*, *12*(10), 2974. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers12102974>
- Shao, W., Xiong, X., Chen, H., Liu, J., Yin, W., Li, S., Xu, X., Zhang, X., & He, J. (2014). Long-term survival outcomes of video-assisted thoracic surgery for patients with non-small cell lung cancer. *Chinese Journal of Cancer Research = Chung-kuo yen cheng yen chiu*, *26*(4), 391–398. <https://doi.org/10.3978/j.issn.1000-9604.2014.08.04>
- Sharma, P., & Allison, J. P. (2015). The future of immune checkpoint therapy. *Science (New York, N.Y.)*, *348*(6230), 56–61. <https://doi.org/10.1126/science.aaa8172>
- Sidaway, P. (2020). MSI-H: a truly agnostic biomarker?. *Nature reviews. Clinical oncology*, *17*(2), 68. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0310-5>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA: a cancer journal for clinicians*, *71*(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>
- Simon, S., Wu, Z., Cruard, J., Vignard, V., Fortun, A., Khammari, A., Dreno, B., Lang, F., Rulli, S. J., & Labarriere, N. (2018). TCR analyses of two vast and shared melanoma antigen-specific T cell repertoires: common and specific features. *Frontiers in immunology*, *9*, 1962. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01962>
- Singal, G., Miller, P. G., Agarwala, V., Li, G., Kaushik, G., Backenroth, D., Gossai, A., Frampton, G. M., Torres, A. Z., Lehnert, E. M., Bourque, D., O'Connell, C., Bowser, B., Caron, T., Baydur, E., Seidl-Rathkopf, K., Ivanov, I., Alpha-Cobb, G., Guria, A., He, J., ... Miller, V. A. (2019).

REFERENCIAS

Association of patient characteristics and tumor genomics with clinical outcomes among patients with non-small cell lung cancer using a clinicogenomic database. *JAMA*, 321(14), 1391–1399. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.3241>

Six, A., Mariotti-Ferrandiz, M. E., Chaara, W., Magadan, S., Pham, H. P., Lefranc, M. P., Mora, T., Thomas-Vaslin, V., Walczak, A. M., & Boudinot, P. (2013). The past, present, and future of immune repertoire biology - the rise of next-generation repertoire analysis. *Frontiers in Immunology*, 4, 413. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00413>

Snyder, A., Nathanson, T., Funt, S. A., Ahuja, A., Buros Novik, J., Hellmann, M. D., Chang, E., Aksoy, B. A., Al-Ahmadie, H., Yusko, E., Vignali, M., Benzeno, S., Boyd, M., Moran, M., Iyer, G., Robins, H. S., Mardis, E. R., Merghoub, T., Hammerbacher, J., Rosenberg, J. E., ... Bajorin, D. F. (2017). Contribution of systemic and somatic factors to clinical response and resistance to PD-L1 blockade in urothelial cancer: an exploratory multi-omic analysis. *PLOS Medicine*, 14(5), e1002309. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002309>

Socinski, M. A., Jotte, R. M., Cappuzzo, F., Orlandi, F., Stroyakovskiy, D., Nogami, N., Rodriguez-Abreu, D., Moro-Sibilot, D., Thomas, C. A., Barlesi, F., Finley, G., Kelsch, C., Lee, A., Coleman, S., Deng, Y., Shen, Y., Kowanzet, M., Lopez-Chave, A., Sandler, A., Reck, M., ... IMpower150 Study Group (2018). Atezolizumab for first-line treatment of metastatic nonsquamous NSCLC. *The New England journal of medicine*, 378(24), 2288–2301. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716948>

Song, P., Yang, D., Cui, X., Wang, H., Si, X., Zhang, X., & Zhang, L. (2020). NLCIPS: Non-Small Cell Lung Cancer Immunotherapy Prognosis Score. *Cancer management and research*, 12, 5975–5985. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S257967>

Song, Z., Chen, X., Shi, Y., Huang, R., Wang, W., Zhu, K., Lin, S., Wang, M., Tian, G., Yang, J., & Chen, G. (2020). Evaluating the potential of T cell receptor repertoires in predicting the prognosis of resectable non-small cell lung cancers. *Molecular therapy. Methods & clinical development*, 18, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.05.020>

Stanculeanu, D. L., Daniela, Z., Lazescu, A., Bunghez, R., & Anghel, R. (2016). Development of new immunotherapy treatments in different cancer types. *Journal of medicine and life*, 9(3), 240–248.

Subbiah, V., Solit, D. B., Chan, T. A., & Kurzrock, R. (2020). The FDA approval of pembrolizumab for adult and pediatric patients with tumor mutational burden (TMB) ≥ 10 : a decision centered on empowering patients and their physicians. *Annals of Oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 31(9), 1115–1118.

<https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.07.002>

Sun, Z., Aubry, M. C., Deschamps, C., Marks, R. S., Okuno, S. H., Williams, B. A., Sugimura, H., Pankratz, V. S., & Yang, P. (2006). Histologic grade is an independent prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer: an analysis of 5018 hospital- and 712 population-based cases. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, *131*(5), 1014–1020. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2005.12.057>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Tavera, R. J., Forget, M. A., Kim, Y. U., Sakellariou-Thompson, D., Creasy, C. A., Bhatta, A., Fulbright, O. J., Ramachandran, R., Thorsen, S. T., Flores, E., Wahl, A., Gonzalez, A. M., Toth, C., Wardell, S., Mansaray, R., Radvanyi, L. G., Gombos, D. S., Patel, S. P., Hwu, P., Amaria, R. N., ... Haymaker, C. (2018). Utilizing T-cell activation signals 1, 2, and 3 for tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) expansion: the advantage over the sole use of interleukin-2 in cutaneous and uveal melanoma. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, *41*(9), 399–405. <https://doi.org/10.1097/CJI.0000000000000230>

Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., & Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. *Advanced drug delivery reviews*, *97*, 4–27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>

Tindle, H. A., Stevenson Duncan, M., Greevy, R. A., Vasan, R. S., Kundu, S., Massion, P. P., & Freiberg, M. S. (2018). Lifetime smoking history and risk of lung cancer: results from the framingham heart study. *Journal of the National Cancer Institute*, *110*(11), 1201–1207. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy041>

Topalian, S. L., Taube, J. M., Anders, R. A., & Pardoll, D. M. (2016). Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, *16*(5), 275–287. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.36>

Travis, W. D. (2020). Lung cancer pathology: current concepts. *Clinics in chest medicine*, *41*(1), 67–85). <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.11.001>

Tray, N., Weber, J. S., & Adams, S. (2018). Predictive biomarkers for checkpoint immunotherapy: current status and challenges for clinical application. *Cancer Immunology Research*, *6*(10), 1122–1128. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0214>

REFERENCIAS

- Trujillo, J. A., Sweis, R. F., Bao, R., & Luke, J. J. (2018). T cell–inflamed versus non-T cell–inflamed tumors: a conceptual framework for cancer immunotherapy drug development and combination therapy selection. *Cancer immunology research*, 6(9), 990–1000. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0277>
- Tumeh, P. C., Harview, C. L., Yearley, J. H., Shintaku, I. P., Taylor, E. J. M., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V., West, A. N., Carmona, M., Kivork, C., Seja, E., Cherry, G., Gutierrez, A. J., Grogan, T. R., Mateus, C., Tomasic, G., Glaspy, J. A., ... Ribas, A. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, 515(7528), 568–571. <https://doi.org/10.1038/nature13954>
- Turner, S. J., Doherty, P. C., McCluskey, J., & Rossjohn, J. (2006). Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nature reviews. Immunology*, 6(12), 883–894. <https://doi.org/10.1038/nri1977>
- Usó, M., Jantus-Lewintre, E., Bremnes, R. M., Calabuig, S., Blasco, A., Pastor, E., Borreda, I., Molina-Pinelo, S., Paz-Ares, L., Guijarro, R., Martorell, M., Forteza, J., Camps, C., Sirera, R. (2016). Analysis of the immune microenvironment in resected non-small cell lung cancer: the prognostic value of different T lymphocyte markers. *Oncotarget*, 7(33), 52849–52861. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10811>
- Valk, E., Rudd, C. E., & Schneider, H. (2008). CTLA-4 trafficking and surface expression. *Trends in Immunology*, 29(6), 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.02.011>
- von Locquenghien, M., Rozalén, C., & Celià-Terrassa, T. (2021). Interferons in cancer immunoediting: Sculpting metastasis and immunotherapy response. *The Journal of Clinical Investigation*, 131(1), e143296. <https://doi.org/10.1172/JCI143296>
- Walboomers, J. M. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J. F., Peto, J., Meijer, C. J. L. M., & Muñoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of Pathology*, 189(1), 12–19. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199909\)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F)
- Walker, L. S. K., & Sansom, D. M. (2015). Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology. *Trends in Immunology*, 36(2), 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.12.001>
- Wang, X., Zhang, B., Yang, Y., Zhu, J., Cheng, S., Mao, Y., Feng, L., & Xiao, T. (2019). Characterization of distinct T cell receptor repertoires in tumor and distant non-tumor tissues from lung cancer patients. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 17(3), 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2018.10.005>

- Wei, S. C., Duffy, C. R., & Allison, J. P. (2018). Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. *Cancer discovery*, *8*(9), 1069–1086. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0367>
- West, H., McCleod, M., Hussein, M., Morabito, A., Rittmeyer, A., Conter, H. J., Kopp, H. G., Daniel, D., McCune, S., Mekhail, T., Zer, A., Reinmuth, N., Sadiq, A., Sandler, A., Lin, W., Ochi Lohmann, T., Archer, V., Wang, L., Kowanz, M., & Cappuzzo, F. (2019). Atezolizumab in combination with carboplatin plus nab-paclitaxel chemotherapy compared with chemotherapy alone as first-line treatment for metastatic non-squamous non-small-cell lung cancer (IMpower130): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, *20*(7), 924–937. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30167-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30167-6)
- Wolchok, J. D., & Saenger, Y. (2008). The mechanism of anti-CTLA-4 activity and the negative regulation of T-cell activation. *The oncologist*, *13* Suppl 4, 2–9. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.13-s4-2>
- Wu, L., & Qu, X. (2015). Cancer biomarker detection: recent achievements and challenges. *Chemical Society reviews*, *44*(10), 2963–2997. <https://doi.org/10.1039/c4cs00370e>
- Wu, S. G., Pan, W., Liu, H., Byrne-Steele, M. L., Brown, B., Depinet, M., Hou, X., Han, J., & Li, S. (2019). High throughput sequencing of T-cell receptor repertoire using dry blood spots. *Journal of translational medicine*, *17*(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1796-4>
- Wu, T., & Dai, Y. (2017). Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer letters*, *387*, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.043>
- Yang, G., Xiao, Z., Tang, C., Deng, Y., Huang, H., & He, Z. (2019). Recent advances in biosensor for detection of lung cancer biomarkers. *Biosensors & bioelectronics*, *141*, 111416). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111416>
- Yang, L., Wang, S., Zhou, Y., Lai, S., Xiao, G., Gazdar, A., & Xie, Y. (2017). Evaluation of the 7th and 8th editions of the AJCC/UICC TNM staging systems for lung cancer in a large North American cohort. *Oncotarget*, *8*(40), 66784–66795. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18158>
- Yarchoan, M., Laheru, D. A., 3rd, Lutz, E. R., Laheru, D.A., & Jaffee, E. M. (2017a). Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nature reviews. Cancer*, *17*(4), 209–222. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.154>
- Yarchoan, M., Hopkins, A., & Jaffee, E. M. (2017b). Tumor mutational burden and response rate to PD-1 inhibition. *The New England journal of medicine*, *377*(25), 2500–2501.

REFERENCIAS

<https://doi.org/10.1056/NEJMc1713444>

Yi, M., Qin, S., Zhao, W., Yu, S., Chu, Q., & Wu, K. (2018). The role of neoantigen in immune checkpoint blockade therapy. *Experimental hematology & oncology*, 7, 28. <https://doi.org/10.1186/s40164-018-0120-y>

Yost, K. E., Chang, H. Y., & Satpathy, A. T. (2021). Recruiting T cells in cancer immunotherapy. *Science (New York, N.Y.)*, 372(6538), 130–131. <https://doi.org/10.1126/science.abd1329>

Yost, K. E., Satpathy, A. T., Wells, D. K., Qi, Y., Wang, C., Kageyama, R., McNamara, K. L., Granja, J. M., Sarin, K. Y., Brown, R. A., Gupta, R. K., Curtis, C., Bucktrout, S. L., Davis, M. M., Chang, A. L. S., & Chang, H. Y. (2019). Clonal replacement of tumor-specific T cells following PD-1 blockade. *Nature Medicine*, 25(8), 1251–1259. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0522-3>

Yuan, M., Huang, L. L., Chen, J. H., Wu, J., & Xu, Q. (2019). The emerging treatment landscape of targeted therapy in non-small-cell lung cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4, 61. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0099-9>

Yusko, E., Vignali, M., Wilson, R. K., Mardis, E. R., Stephen Hodi, F., Horak, C., Chang, H., Woods, D. M., Robins, H., & Weber, J. (2019). Association of tumor microenvironment T-cell repertoire and mutational load with clinical outcome after sequential checkpoint blockade in melanoma. *Cancer immunology research*, 7(3), 458–465. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0226>

Zeng, D. Q., Yu, Y. F., Ou, Q. Y., Li, X. Y., Zhong, R. Z., Xie, C. M., & Hu, Q. G. (2016). Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes for clinical therapeutic research in patients with non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 7(12), 13765–13781. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7282>

Zhang, C., Ding, H., Huang, H., Palashati, H., Miao, Y., Xiong, H., & Lu, Z. (2019). TCR repertoire intratumor heterogeneity of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in centers and margins of localized lung adenocarcinomas. *International journal of cancer*, 144(4), 818–827. <https://doi.org/10.1002/ijc.31760>

Zhang, J., Ji, Z., Caushi, J. X., El Asmar, M., Anagnostou, V., Cottrell, T. R., Chan, H. Y., Suri, P., Guo, H., Merghoub, T., Chaft, J. E., Reuss, J. E., Tam, A. J., Blosser, R. L., Abu-Akeel, M., Sidhom, J.-W., Zhao, N., Ha, J. S., Jones, D. R., Marrone, K. A., ... 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 : an official journal of the American Association for Cancer Research, 26(6), 1327–1337. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-2931>

Zhang, Y., & Zheng, J. (2020). Functions of Immune Checkpoint Molecules Beyond Immune Evasion. *Advances in experimental medicine and biology*, 1248, 201–226. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3266-5_9

Zhuang, Y., Zhang, C., Wu, Q., Zhang, J., Ye, Z., & Qian, Q. (2019). Application of immune repertoire sequencing in cancer immunotherapy. *International immunopharmacology*, 74, 105688. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105688>

VII. MATERIALES SUPLEMENTARIOS

Tabla S1. Sistema de estadificación TNM de cáncer de pulmón.

T (tumor primario)	
Tx	Tumor primario no puede ser evaluado, o tumor evidenciado por la presencia de células malignas en esputo o lavados bronquiales pero no evidenciado en pruebas de imagen o broncoscopia.
T0	Sin evidencia de tumor primario.
Tis	Carcinoma in situ.
T1	Tumor ≤ 3 cm en su diámetro mayor.
T1a (mi)	Carcinoma mínimamente invasivo.
T1a	Tumor ≤ 1 cm en su diámetro mayor.
T1b	Tumor > 1 cm pero ≤ 2 cm en su diámetro mayor.
T1c	Tumor > 2 cm pero ≤ 3 cm en su diámetro mayor.
T2	Tumor >3 cm pero ≤ 5 cm o tumor que involucra: pleura visceral, bronquio principal (no carina), atelectasia o neumonitis obstructiva al hilio.
T2a	Tumor > 3 cm pero ≤ 4 cm en su diámetro mayor.
T2b	Tumor > 4 cm pero ≤ 5 cm en su diámetro mayor.
T3	Tumor > 5 cm pero ≤ 7 cm en su diámetro mayor o tumor con invasión de la pared torácica, pericardio, nervio frénico o nódulos tumorales separados en el mismo lóbulo.
T4	Tumor > 7 cm en su diámetro mayor o tumor con invasión tumoral del mediastino, diafragma, corazón, grandes vasos, nervio laríngeo recurrente, carina, tráquea, esófago, columna vertebral o nódulos tumorales en un lóbulo ipsilateral diferente.
N (afectación de ganglios linfáticos regionales)	
Nx	No se puede medir la afectación en los ganglios linfáticos regionales
N0	Sin metástasis de ganglios regionales.
N1	Metástasis en ganglios hiliares y/o peribronquiales o pulmonares ipsilaterales.
N2	Metástasis en los ganglios mediastínicos y/o subcarinales ipsilaterales.
N3	Metástasis en los ganglios mediastínicos y/o hiliares contralaterales o supraclaviculares.
M (metástasis a distancia)	
M0	Sin metástasis a distancia.
M1	Existencia de metástasis a distancia.
M1a	Tumor con derrame pleural / nódulo pleurales o pericárdicos / nódulo(s) tumoral(es) en lóbulo contralateral.
M1b	Metástasis extratorácica única.
M1c	Múltiples metástasis extratorácicas (1 o > 1 órgano)

Adaptado y traducido de Detterbeck et al., 2017.

Tabla S2. Octava edición del sistema TNM en cáncer de pulmón.

T/M	N0	N1	N2	N3
T1a	IA1	IIB	IIIA	IIIB
T1b	IA2	IIB	IIIA	IIIB
T1c	IA3	IIB	IIIA	IIIB
T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB
T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
M1a	IVA	IVA	IVA	IVA
M1b	IVA	IVA	IVA	IVA
M1c	IVB	IVB	IVB	IVB

Adaptado y traducido de Detterbeck et al., 2017. Combinando la situación T, N y M el cáncer se clasifica por estadios en I, II, III o IV, las cuales se subdividen en A, B y C en algunos casos. Para los estadios I-III, el cáncer no presenta metástasis a distancia (M0), y se estadifica teniendo en cuenta los factores T y N. Para el estadio IVA y IVB, el cáncer puede ser de cualquier T y cualquier N, y presenta características de M1a o M1b, y de M1c, respectivamente.

Tabla S3. Características demográficas de cada uno de los pacientes.

Paciente	Edad	Sexo	Hábito tabáquico	Paquete/año
P1	59	Hombre	Fumador	41
P2	64	Hombre	Fumador	66
P3	63	Hombre	Fumador	42
P4	69	Hombre	Fumador	20
P5	61	Hombre	Fumador	48
P6	84	Mujer	Nunca fumador	0
P7	73	Hombre	Fumador	112
P8	63	Hombre	Fumador	135
P9	65	Mujer	Fumador	80
P10	55	Hombre	Fumador	41
P11	82	Hombre	Exfumador	60
P12	54	Hombre	Exfumador	45
P13	51	Mujer	Nunca fumador	0
P14	68	Hombre	Exfumador	42
P15	59	Mujer	Fumador	113
P16	75	Hombre	Fumador	75
P17	79	Hombre	Exfumador	50
P18	73	Hombre	Exfumador	110
P19	71	Hombre	Fumador	54
P20	52	Hombre	Fumador	40
P21	69	Hombre	Fumador	52
P22	57	Hombre	Fumador	29
P23	87	Mujer	Exfumador	20
P24	67	Mujer	Fumador	56
P25	52	Hombre	Fumador	29
P26	75	Hombre	Fumador	12
P27	57	Hombre	Fumador	38
P28	70	Hombre	Fumador	50
P29	53	Hombre	Fumador	105
P30	71	Mujer	Fumador	49
P31	46	Mujer	Fumador	15
P32	66	Mujer	Fumador	60
P33	52	Hombre	Fumador	36

Tabla S4. Características clínico-patológicas de cada uno de los pacientes.

P	Histología	Estadio	Tamaño tumoral	Nº.		Tratamiento en primera-línea	Respuesta		
				localizaciones metastásicas	PD-L1 TPS		a los 6 meses	SLP (meses)	SG (meses)
P1	ADC	IVA	5 cm	1	90	Pembrolizumab	PE	1,77 ⁺	21,67
P2	ADC	IVA	1,3 cm	1	80	Pembrolizumab	RP	20	20
P3	ADC	IVA	2,4 cm	1	60	Pembrolizumab	RP	20,57	20,57
P4	ADC	IVA	4,2 cm	1	90	Pembrolizumab	PE	2,67 ⁺	20,57
P5	ADC	IVA	5,1 cm	1	70	Pembrolizumab	EE	20,83	20,83
P6	PD	IVA	3,1 cm	1	80	Pembrolizumab	EE	20,7	20,7
P7	ADC	IVA	6 cm	3	100	Pembrolizumab	EE	6,67 ⁺	12,7 ⁺
P8	ADC	IVA	5,4 cm	2	70	Pembrolizumab	PE	2,8 ⁺	5,87 ⁺
P9	ADC	IVB	4,6 cm	6	70	Pembrolizumab	RP	18,47	18,47
P10	ADC	IVA	6,8 cm	8	100	Pembrolizumab	RP	18	18
P11	ADC	IIIB	6,3 cm	0	95	Pembrolizumab	RP	17,57	17,57
P12	SCC	IVA	1,5 cm	1	90	Pembrolizumab	EE	20,83	20,83
P13	ADC	IVA	3,6 cm	2	70	Pembrolizumab	EE	8,27 ⁺	10,07 ⁺
P14	ADC	IVB	9 cm	2	90	Pembrolizumab	PE	3,27 ⁺	5,63 ⁺
P15	ADC	IVB	1,9 cm	3	90	Pembrolizumab	RP	15,2	15,2
P16	SCC	IIIA	4 cm	0	60	Pembrolizumab	EE	11,57 ⁺	16,07
P17	ADC	IVB	4,6 cm	4	70	Pembrolizumab	EE	14,3	14,3
P18	SCC	IIIA	1,2 cm	0	60	Pembrolizumab	PE	1,4 ⁺	3,07 ⁺
P19	PD	IIIC	11,2 cm	0	70	Pembrolizumab	EE	10,6	10,6
P20	ADC	IVA	3,3 cm	2	90	Pembrolizumab	EE	20,73	20,73
P21	PD	IVB	4,3 cm	3	90	Pembrolizumab	PE	4,87 ⁺	5 ⁺
P22	SCC	IIIB	7,3 cm	0	60	Pembrolizumab	PE	1,67 ⁺	3,57 ⁺
P23	LCC	IIIB	6 cm	0	80	Pembrolizumab	PE	1,4 ⁺	6,5 ⁺
P24	ADC	IVA	3,5 cm	2	60	Pembrolizumab	RP	12,93 ⁺	19,87
P25	ADC	IVB	4,9 cm	16	2	Pembro/QT	RP	13,83	13,83

P	Histología	Estadio	Tamaño tumoral	Nº.		Tratamiento en primera-línea	Respuesta		
				localizaciones metastásicas	PD-L1 TPS		a los 6 meses	SLP (meses)	SG (meses)
P26	ADC	IVB	9,7 cm	4	0	Pembro/QT	RP	12,13	12,13
P27	ADC	IVB	2,5 cm	14	0	Pembro/QT	PE	2,83 †	3,8 †
P28	PD	IVB	5,1 cm	4	0	Pembro/QT	EE	12,2	12,2
P29	ADC	IVA	8 cm	1	0	Pembro/QT	RP	8,57	8,57
P30	ADC	IVB	4,7 cm	4	0	Pembro/QT	RP	12 †	12,07 †
P31	ADC	IVA	5 cm	4	0	Pembro/QT	PE	4,87 †	4,93 †
P32	ADC	IVA	5,4 cm	1	10	Pembro/QT	PE	5,77 †	6,33 †
P33	ADC	IVB	6,6 cm	8	10	Pembro/QT	RP	8,33	8,33

P: paciente; ADC: adenocarcinoma; SCC: carcinoma de células escamosas o epidermoides; LCC: carcinoma de células grandes; PD: pobremente diferenciado; PD-L1 TPS: la expresión de PD-L1 se evaluó mediante puntuaciones de proporción de tumores (TPS, *tumor proportion score*); Pembro/QT: Pembrolizumab-Cisplatino-Pemetrexed; PE: progresión de enfermedad; EE: enfermedad estable; RP: respuesta parcial; SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global. † Progresión o exitus durante el seguimiento.

VIII. ANEXOS

1. APROBACIÓN COMITÉ DE ÉTICA DE LA INSTITUCIÓN



Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación Clínica

APROBACIÓN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

- ANEXO 11 -

Este CEIm tras evaluar en su reunión de 29 de Junio de 2017 el Proyecto de Investigación:

Título:	Identificación de marcadores inmuno-relacionados en muestras de pacientes con CPNM. Implicaciones pronosticas y terapéuticas		
I.P.:	Dr. Carlos Camps Herrero	Servicio/Unidad	Oncología

Acuerda respecto a esta documentación:

Que se cumplen los requisitos éticos y metodológicos y la Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado presentado reúnen las condiciones exigidas por este CEIC, por tanto se decide su APROBACIÓN.

COMPOSICIÓN DEL CEIm

Presidenta:

Dra. Elena Rubio Gomis (Unidad de Farmacología Clínica)

Vocales:

Dr. Ernesto Bataller Alonso (Gerencia del CHGUV)
 Dr. Alberto Berenguer Jofresa (Servicio de Cardiología)
 Dra. Ana Blasco Cordellat (Servicio de Oncología)
 Dra. Pilar Blasco Segura (Servicio de Farmacia)
 Dr. Julio Cortijo Gimeno (Unidad de Docencia e Investigación)
 Dña. Encarna Domingo Cebrián (Servicio de Estomatología)
 Dña. Maria Teresa Jareño Roglán (Unidad de Reanimación Cardiaca)
 Dr. Gustavo Juan Samper (Servicio de Neumología)
 Dra. Goitzane Marcaida Benito (Servicio de Análisis Clínicos)
 Dr. Antonio Martorell Aragonés (Unidad de Alergología)
 Dr. Javier Milara Payá (Servicio de Farmacia)
 D. Alejandro Moner González (Gerencia CHGUV – Asesoría Jurídica)
 Dr. Enrique Ortega Gonzalez (Gerente CHGUV)
 Dr. Pedro Polo Martín (Pediatra Att Primaria)



 Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

 Comité Ético de Investigación Clínica

Dr. Aurelio Quesada Dorador (Servicio de Cardiología)
 Dra. M^a José Safont Aguilera (Servicio de Oncología)
 Dña. Carmen Sarmiento Cabañes (Miembro independiente de la organización asistencial)

Secretario:

Dr. Elías Ruiz Rojo (Servicio de Farmacia – Atención Primaria)

El CEIm del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) tanto en su composición como en sus procedimientos y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que en el caso de que algún miembro participe en el ensayo o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del ensayo clínico

Lo que comunico a efectos oportunos:

Valencia a 03 de julio de 2017

Fdo. Dra Elena Rubio Gomis (Presidenta CEIC CHGUV)
 

- **ACLARACIONES:** La presente tesis doctoral fue un subproyecto dentro del proyecto “Identificación de marcadores inmuno-relacionados en muestras de pacientes con CPNM. Implicaciones pronósticas y terapéuticas”.

2. DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



DOCUMENTO DE INFORMACION AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

DONANTE: _____

ACERCA DE LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA OBTENIDAS EN EL CURSO DE PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS, TERAPÉUTICOS O DIAGNÓSTICOS.

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN	Oncología Molecular
INVESTIGADOR PRINCIPAL	Dr. Carlos Camps
CENTRO	Servicio de Oncología Médica (SOM) del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV) y Laboratorio de Oncología Molecular de la Fundación para la Investigación del Hospital General Universitario de Valencia (FIHGUV)
EQUIPO INVESTIGADOR	Facultativos del SOM, personal de la Unidad de Investigación Clínica del SOM, y del laboratorio de Oncología Molecular, miembros de los servicios quirúrgicos involucrados (Cirugía Torácica, Cirugía General), facultativos del servicio de Anatomía Patológica.

1. DESCRIPCIÓN GENERAL: La línea de investigación de “**Oncología Molecular**” centra sus esfuerzos en la comprensión de la patogénesis de los eventos genéticos y moleculares implicados en el origen y la progresión del cáncer. Uno de los aspectos de mayor interés en esta línea de investigación es la búsqueda de biomarcadores que puedan ser usados en la clínica y ayuden a la individualización del tratamiento del cáncer.

PROPÓSITO DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: Analizar en diferentes tipos de muestras, factores que puedan ser importantes en el diagnóstico, pronóstico y en la respuesta del cáncer a los tratamientos empleados, así como en la aparición de efectos tóxicos asociados a dichos tratamientos. Si bien la constitución genética de los seres humanos es muy similar, existen pequeñas diferencias entre las personas que, en algunos casos podrían asociarse con el desarrollo o evolución de diferentes enfermedades. Por otra parte, los tumores también presentan diferencias a nivel genético que necesitan seguir siendo estudiadas. Por lo tanto, para poder llevar a cabo esta línea de investigación, es necesario disponer de muestras biológicas para poder realizar estos estudios genéticos. También es necesario recoger datos sobre su historial médico para obtener información que pudiera tener relevancia para nuestros estudios.

2. IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO: Durante la intervención quirúrgica o la prueba diagnóstica a la que va a ser sometido en las instalaciones del CHGUV se tomarán muestras de sus tejidos y/o sangre. El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente una parte de la muestra biológica sobrante de la intervención o prueba a una colección de muestras que se usará con fines de investigación biomédica, sin que esto suponga ningún riesgo añadido para su salud ni comprometa el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad. También es posible que le recojamos muestras biológicas que no requieran un procedimiento invasivo, como orina heces, saliva etc. o que el procedimiento de obtención sea mínimamente invasivo como una extracción de sangre. Las muestras que done se almacenarán en una colección de muestras que corresponden a una Línea de Investigación sobre Oncología Molecular, que se encuentra en las instalaciones de la FIHGUV y que cumple con los requerimientos establecidos en la normativa vigente.

Sus muestras solo podrán ser utilizadas en proyectos de investigación avalados científicamente y que hayan sido evaluados y aprobados por el CEIC, en los que participen miembros del equipo investigador que forma parte de esta línea de investigación.

3. OBJETIVO: El Centro Sanitario en el que usted está siendo atendido/tratado, dispone de investigadores que desean recoger y almacenar sus muestras biológicas para poder realizar proyectos de investigación biomédica en el área de la Oncología. Los resultados de dichos proyectos de investigación pueden derivar en el descubrimiento de nuevos métodos para el mejor diagnóstico, pronóstico y tratamientos.



4. BENEFICIOS ESPERADOS: Por su participación no percibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por las muestras donadas. Sin embargo, si las intervenciones que se pudieran realizar tuvieran éxito, podrían ayudar en el futuro a pacientes que tienen la misma enfermedad o padecen otras enfermedades similares. Las muestras de los tejidos y/o sangre no serán vendidas o distribuidas a terceros con fines comerciales. La donación de muestras no impedirá que usted o su familia puedan hacer uso de ellas siempre que estén disponibles, cuando por razones de salud puedan ser necesarias.

5. CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU REALIZACIÓN: Sólo si usted lo desea, existe la posibilidad de que pueda ser contactado en el futuro para completar o actualizar la información con la que contamos relacionada con su enfermedad.

Es posible, que los estudios realizados sobre sus muestras aporten información relevante para su salud o la de sus familiares. Tiene derecho tanto a ser informado como a que no se le informe de los datos obtenidos en la investigación. A estos efectos se entenderá que no desea recibir tal información salvo que manifieste lo contrario, utilizando para ello el formulario que se adjunta al presente documento.

6. CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU NO REALIZACIÓN Y DERECHO DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO. La decisión de donar muestras biológicas es totalmente voluntaria, pudiendo negarse a donarlas e incluso pudiendo revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe en el Centro.

Si decidiera revocar el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras que no se hayan utilizado en la investigación, será destruida o anonimizada. Tales efectos, no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se han llevado a cabo una vez haya revocado su consentimiento.

7. RIESGOS. El procedimiento que se le propone no supone ningún riesgo añadido para su salud ni compromete el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad, puesto que se trata de muestras sobrantes de la intervención, muestras invasivas obtenidas durante los procedimientos de diagnóstico, o muestras de sangre extra que se han obtenido para ser utilizadas en investigación. En este último caso, la extracción de sangre, apenas tiene efectos secundarios, lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en la zona de punción que desaparecen transcurridos 1 o 2 días. En el caso de las muestras que requieren procedimientos más complejos o invasivos, estos sólo se realizarán si forman parte del procedimiento habitual que debe realizarse para su correcto diagnóstico o tratamiento de su enfermedad.

8. PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES Y CONFIDENCIALIDAD. Sus datos personales y de salud serán incorporados y tratados en una base de datos de la que es responsable el Investigador del Proyecto, que debe estar inscrita en un registro nacional dependiente del Instituto de Salud Carlos III y que debe cumplir con todos los requisitos legales. Sólo el INVESTIGADOR RESPONSABLE podrá relacionar estos datos con usted, siendo responsable de custodiar el documento de consentimiento y de garantizar el cumplimiento de su voluntad en relación al uso de la muestra biológica que usted cede para investigación. La información será procesada durante el análisis de los datos obtenidos y aparecerá en los informes y/o memorias de los proyectos derivados de la Línea de Investigación, aunque en ningún caso será posible identificarle, asegurando en todo momento el cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

La cesión de muestras así como de la información contenida en las bases de datos vinculadas a las mismas, solo se realizará si forman parte de la línea de investigación en la cual participan miembros del equipo investigador, realizándose un procedimiento de codificación previo, que consiste en desligar la información que le identifica sustituyéndola por un código.

Asimismo, el titular de los datos personales podrá ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición al tratamiento de datos de carácter personal, incluir alguna restricción sobre el uso de sus muestras, y ejercer los derechos de revocación del consentimiento (en este último caso, conforme al formulario que figura en el apartado 11) en los términos previstos en la normativa aplicable, dirigiendo al titular del centro el escrito correspondiente firmado por Ud. y copia de un documento acreditativo de su identidad.



9. DESTINO DE LAS MUESTRAS TRAS FINALIZACION DE LA LÍNEA DE INVESTIGACION. En el supuesto de finalización de la línea de investigación, es posible que existan muestras sobrantes. En relación a las mismas, se le ofrecen las siguientes opciones: a) la destrucción de la muestra sobrante, b) su utilización en otros proyectos de investigación biomédica, para lo cual, se le ofrece la opción de donar la muestra excedente al Biobanco del CHGUV (en el siguiente apartado le explicamos de manera resumida en que consiste un biobanco y cuáles son sus objetivos). En este caso, deberá marcar esta opción en el consentimiento incluido en este documento. En dicho consentimiento usted podrá escoger si desea que esta donación se haga codificada de forma que usted pueda conocer si lo desea los resultados de las investigaciones que se lleven a cabo, o anonimizada, si usted prefiere que nunca nadie pueda recobrar la relación entre sus muestras y su persona.

10. BIOBANCO. DEFINICIÓN Y OBJETIVOS. El Biobanco del CHGUV es un establecimiento público, sin ánimo de lucro, que acoge una colección organizada de muestras biológicas. Estas muestras almacenadas en el biobanco, tienen por finalidad ser utilizadas en proyectos de investigación biomédica que hayan sido aprobados por los comités ético y científico a los que esté adscrito el biobanco. Los resultados de las investigaciones realizadas con estas muestras pueden derivar en el descubrimiento de nuevos métodos para el mejor diagnóstico de las enfermedades o en nuevas formas de tratamientos de las mismas. Sus muestras seguirán almacenadas en el biobanco hasta el fin de las existencias si no existe una revocación del presente consentimiento.



11. DECLARACIONES Y FIRMAS.

Declaración del donante:

D./Dña _____, de _____ años de edad, con domicilio en _____, DNI _____ y nº de SIP _____

D./Dña _____, de _____ años de edad, con domicilio en _____, DNI _____ en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente _____, con DNI _____ y nº de SIP _____

DECLARO

Que he sido informado por el profesional de salud abajo firmante:

- Sobre las ventajas e inconvenientes del procedimiento
- Sobre el lugar de obtención, almacenamiento y proceso que sufrirán los datos personales y las muestras.
- Que mis muestras y datos personales serán tratados de acuerdo a la legislación vigente.
- Que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento y solicitar la eliminación o anonimización de todos mis datos personales y muestras que permanezcan almacenadas. Esta eliminación no se extendería a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hubieran llevado a cabo
- Que en cualquier momento, yo, mi representante legal, o tutor, de conformidad con lo establecido en el artículo 4, punto 5 de la Ley 14/2007, de 3 de Julio, puedo solicitar información sobre los datos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas.
- Que he comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas

CONSIENTO

- Que el CHGUV y la FIHGUV, a través de los miembros del equipo investigador de la Línea de Investigación: "Oncología Molecular", utilicen mis datos y las muestras, incluyendo la información sobre mi salud, para investigaciones biomédicas dentro del marco de la línea de investigación antes mencionada, manteniendo siempre la confidencialidad de mis datos.
- Libre y voluntariamente en la donación voluntaria de: (márquese con una cruz lo que proceda)

<input type="checkbox"/> Mis tejidos excedentes	<input type="checkbox"/> Muestra de heces, orina o saliva
<input type="checkbox"/> Muestra de sangre	<input type="checkbox"/> Muestras obtenidas en procedimientos que sean necesario para el diagnóstico)
- Yo, mi representante legal o tutor, accedo (márquese sí o no) a que los miembros del equipo investigador puedan contactarme en el futuro en el caso de que se estime oportuno añadir nuevos datos a los recogidos.

<input type="checkbox"/> Sí
<input type="checkbox"/> No
- Que en el supuesto de finalización de la línea de investigación, mis muestras sean (márquese con una cruz lo que proceda)

<input type="checkbox"/> destruidas
<input type="checkbox"/> cedidas al Biobanco del CHGUV y anonimizadas
<input type="checkbox"/> cedidas al Biobanco del CHGUV codificada, junto a los datos clínicos asociados.

D. Dña : _____ FIRMA: _____

En _____, a _____ de _____ de 20 _____

DECLARACIÓN DEL PROFESIONAL DE SALUD:

He informado debidamente al donante:

Nombre facultativo: _____ DNI _____ Colegiado Nº _____

FIRMA : _____

En _____, a _____ de _____ de 20 _____



12. REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO.

Yo, D./Dña _____, con DNI _____ revoco el consentimiento prestado en fecha _____ de _____ de 20____ y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

Fdo: _____

En _____, a _____ de _____ de 20_____

Yo, D./Dña _____, con DNI _____ como representante legal de D./ Dña _____, con DNI _____ revoco el consentimiento prestado en fecha _____ de _____ de 20____ y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

Fdo: _____

En _____, a _____ de _____ de 20_____



SOLICITUD DE INFORMACION DE DATOS O RESULTADOS DERIVADOS DE LAS INVESTIGACIONES

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN	Oncología Molecular
-------------------------------	---------------------

PACIENTE: _____

<p>D./Dña _____, de ____ años de edad, con domicilio en _____, DNI _____ y nº de SIP _____</p> <p>D./Dña _____, de ____ años de edad, con domicilio en _____, DNI _____ en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente _____, con DNI _____ y nº de SIP _____</p>
--

SOLICITO

Ser informado/a del resultado de las investigaciones realizadas con la/las muestra/s donada/s de manera voluntaria en fecha _____ de _____ de 20____ si éstas afectan a mi salud o a la de mi representado.

Fdo.: _____

En _____, a _____ de _____ de 20____

3. FINANCIACIÓN

Esta tesis fue financiada por las siguientes instituciones:

- Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer: CB16-12-00350
- Instituto de Salud Carlos III: PI18/00266
- Beca China Scholarship Council (CSC)

4. COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

- Ning Dong, Sandra Gallach, Andrea Moreno, Feiyu Zhang, Antolina Panizza, Marina Meri, Francisco Aparisi, Ana Blasco, Macarena Ferrero Gimeno, Silvia Calabuig Fariñas, Eloísa Jantus-Lewintre, Carlos Camps. **Characterization of T-cell receptor β -chains repertoire in non-small cell lung cancer patients treated with immunotherapy**. Poster. 13th GECP Congress on Lung Cancer. Valencia, Spain. 21 – 22 November, 2019.
- N. Dong, A. Panizza, A. Moreno, S. Gallach, F. Zhang, M. Meri Abad, F.D.A. Aparisi, A. Blasco Cordellat, I. Shaheen, M. Ferrero Gimeno, S. Calabuig-Fariñas, E. Jantus-Lewintre, C. Camps Herrero. **Profiling of peripheral T cell receptor beta chain repertoire in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with anti-PD1**. Poster. ESMO Virtual Congress 2020. 19 – 21 September, 2020.
- Ning Dong, Antolina Panizza, Andrea Moreno, Sandra Gallach, Feiyu Zhang, Marina Meri, Francisco Aparisi, Ana Blasco, Ihsan Shaheen, Macarena Ferrero Gimeno, Silvia Calabuig-Fariñas, Eloísa Jantus-Lewintre, Carlos Camps. **Caracterización del repertorio de las cadenas β del receptor de células T (TCR- β) de sangre periférica en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) tratados con anti-PD1**. Poster. SEOM Virtual Congress 2020. 20 – 23 October, 2020.

- Ning Dong, Antolina Panizza, Andrea Moreno, Sandra Gallach, Feiyu Zhang, Marina Meri, Francisco Aparisi, Ana Blasco, Ihsan Shaheen, Macarena Ferrero Gimeno, Silvia Calabuig-Fariñas, Eloísa Jantus-Lewintre, Carlos Camps. **Characterization of peripheral T-cell receptor β chain repertoire in advanced non-small cell lung cancer patients treated with pembrolizumab.** Poster. IASLC Liquid Biopsy Virtual Congress 2020. 2 – 3 October, 2020.
- Ning Dong, Antolina Panizza, Andrea Moreno, Sandra Gallach, Feiyu Zhang, Marina Meri, Francisco Aparisi, Ana Blasco, Ihsan Shaheen, Macarena Ferrero Gimeno, Silvia Calabuig-Fariñas, Eloísa Jantus-Lewintre, Carlos Camps. **Profiling of peripheral T-cell receptor β chain repertoire in advanced non-small cell lung cancer patients treated with pembrolizumab.** Poster. 14th GECP Congress on Lung Cancer. Virtual Congress. 24 – 26 November, 2020.
- Ning Dong, Feiyu Zhang, Andrea Moreno, Sandra Gallach, Marina Meri, Ana Blasco, Macarena Ferrero, Silvia Calabuig-Fariñas, Eloísa Jantus-Lewintre, Carlos Camps. **Peripheral T-cell receptor beta-chain repertoire as prognostic biomarker to immunotherapy with anti-PD1 in advanced non-small cell lung cancer.** Oral. VI Simposio Biopsia Líquida. Virtual Congress. 25 – 28 January, 2021.

5. PUBLICACIÓN DERIVADA DE LA TESIS DOCTORAL

- Ning Dong, Andrea Moreno-Manuel, Silvia Calabuig-Fariñas, Sandra Gallach, Feiyu Zhang, Ana Blasco, Francisco Aparisi, Marina Meri-Abad, Ricardo Guijarro, Rafael Sirera, Carlos Camps, Eloísa Jantus-Lewintre. **Characterization of circulating T cell receptor repertoire provides information about clinical outcome after PD-1 blockade in advanced non-small cell lung cancer patients.** *Cancers*. 12 June 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers13122950>. IF: 6.639.

Article

Characterization of Circulating T Cell Receptor Repertoire Provides Information about Clinical Outcome after PD-1 Blockade in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients

Ning Dong ¹, Andrea Moreno-Manuel ^{1,2}, Silvia Calabuig-Fariñas ^{1,2,3,4}, Sandra Gallach ^{1,2,3}, Feiyu Zhang ¹, Ana Blasco ^{2,3,5}, Francisco Aparisi ⁶, Marina Meri-Abad ⁵, Ricardo Guijarro ^{2,3,7,8}, Rafael Sirera ^{2,3,9}, Carlos Camps ^{1,2,3,5,10,*} and Eloísa Jantus-Lewintre ^{1,2,3,9,*}

¹ Molecular Oncology Laboratory, Fundación Investigación, Hospital General Universitario de Valencia, 46014 Valencia, Spain; dongning@alumni.uv.es (N.D.); moreno_andman@externos.gva.es (A.M.-M.); calabui_x_sil@gva.es (S.C.-F.); gallach_sangar@gva.es (S.G.); zfei@alumni.uv.es (F.Z.)

² Unidad Mixta TRIAL, Centro Investigación Príncipe Felipe—Fundación Investigación, Hospital General Universitario de Valencia, 46014 Valencia, Spain; blasco_ana@gva.es (A.B.); guijarro_ricjor@gva.es (R.G.); rsirera@btc.upv.es (R.S.)

³ Centro de Investigación Biomédica en Red Cáncer, CIBERONC, 28029 Madrid, Spain

⁴ Department of Pathology, Universitat de València, 46010 Valencia, Spain

⁵ Department of Medical Oncology, Hospital General Universitario de Valencia, 46014 Valencia, Spain; mamea2@alumni.uv.es

⁶ Department of Medical Oncology, Hospital General de Requena, 46340 Valencia, Spain; aparisi_fraapa@gva.es

⁷ Department of Surgery, Universitat de València, 46010 Valencia, Spain

⁸ Department of Thoracic Surgery, Hospital General Universitario de Valencia, 46014 Valencia, Spain

⁹ Department of Biotechnology, Universitat Politècnica de València, 46022 Valencia, Spain

¹⁰ Department of Medicine, Universitat de València, 46010 Valencia, Spain

* Correspondence: camps_car@gva.es (C.C.); jantus_elo@gva.es (E.J.-L.)



Citation: Dong, N.; Moreno-Manuel, A.; Calabuig-Fariñas, S.; Gallach, S.; Zhang, F.; Blasco, A.; Aparisi, F.; Meri-Abad, M.; Guijarro, R.; Sirera, R.; et al. Characterization of Circulating T Cell Receptor Repertoire Provides Information about Clinical Outcome after PD-1 Blockade in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Cancers* **2021**, *13*, 2950. <https://doi.org/10.3390/cancers13122950>

Academic Editor: Viviana Bazan

Received: 20 April 2021

Accepted: 10 June 2021

Published: 12 June 2021

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



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Immune checkpoint blockers (ICBs) have demonstrated durable anti-tumor responses in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). Despite progress in development of new predictive biomarkers, such as PD-L1 expression, TMB, or MSI, there is still an urge for a better selection of patients that will benefit from the blockade of PD-1/PD-L1 axis. In this study, peripheral blood T cell receptor beta chain (TCR- β) repertoire, at baseline (PRE) and first response (FR) assessment, was analyzed with high-throughput sequencing in a cohort of advanced NSCLC patients receiving first-line pembrolizumab. Our results suggest that measuring TCR- β features in peripheral blood may be a potential tool to assess patients' immune response. Furthermore, the usage of the TRBV20-1 segment highly predicts host response and survival in anti-PD-1 treated NSCLC patients.

Abstract: Despite the success of immunotherapies in lung cancer, development of new biomarkers for patient selection is urgently needed. This study aims to explore minimally invasive approaches to characterize circulating T cell receptor beta chain (TCR- β) repertoire in a cohort of advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with first-line pembrolizumab. Peripheral blood samples were obtained at two time points: i) pretreatment (PRE) and ii) first response assessment (FR). Next-generation sequencing (NGS) was used to analyze the hypervariable complementary determining region 3 (CDR3) of TCR- β chain. Richness, evenness, convergence, and Jaccard similarity indexes plus variable (V) and joining (J)-gene usage were studied. Our results revealed that increased richness during treatment was associated with durable clinical benefit (DCB; $p = 0.046$), longer progression-free survival (PFS; $p = 0.007$) and overall survival (OS; $p = 0.05$). Patients with Jaccard similarity index ≥ 0.0605 between PRE and FR samples showed improved PFS ($p = 0.021$). Higher TRBV20-1 PRE usage was associated with DCB ($p = 0.027$). TRBV20-1 levels $\geq 9.14\%$ in PRE and $\geq 9.02\%$ in FR significantly increased PFS ($p = 0.025$ and $p = 0.016$) and OS ($p = 0.035$ and $p = 0.018$). Overall, analysis of circulating TCR- β repertoire may provide information about the immune response in anti-PD-1 treated NSCLC patients; in this scenario, it can also offer important information about the clinical outcome.

Keywords: non-small cell lung cancer; immune checkpoint blockade; immunotherapy; biomarker; T cell receptor beta chain repertoire; high-throughput sequencing; liquid biopsy; next-generation sequencing; TCR; CDR3

1. Introduction

Lung cancer is one of the leading causes of cancer death worldwide, with a 5-year overall survival rate of less than 20% [1,2]. Recent advancements in immunotherapy, focused on immune checkpoint blockers (ICBs), specifically programmed cell death protein 1 (PD-1) and programmed death-ligand 1 (PD-L1) inhibitors in different histologic features, have opened up new horizons and remarkably improved the clinical outcomes of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) [3–5]. At present, the expression level of PD-L1 on tumor cells and/or tumor-infiltrating immune cells has been correlated with the response to ICBs and is considered the most available and implemented biomarker to select patients [6]. However, there is evidence that many patients whose tumor cells express high levels of PD-L1 exhibit poor response, while others with low or undetectable levels of PD-L1 show objective responses to ICBs, limiting its use in routine clinical practice [7,8].

Recently, additional biomarkers, such as microsatellite instability-high/deficient mismatch repair (MSI-H/dMMR) and tumor mutational burden (TMB), have been approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) as additional ICB predictive biomarkers [9–11]. Multiple data have supported that high TMB is associated with improved response to ICBs therapy across several cancer types, including NSCLC [12–14]. Nevertheless, some limitations, such as the absence of standardization of TMB according to tumor histologies, no consistent correlation with overall survival, and the evidence that this biomarker does not correlate properly and linearly with the neoantigen load, highlight that the predictive value of TMB for immunotherapy must be confirmed in more precise studies [15]. Furthermore, one additional challenge for TMB estimation is the lack of adequate tissue available at diagnosis. In this way, a pilot study has shown the feasibility of applying TMB determination to cytological samples, although this finding needs to be confirmed in more extensive cohorts [16]. Therefore, new predictive and prognostic biomarkers are still under study to accurately direct therapeutic decisions. Among others, T cell profiling may have great relevance since it is closely related to the presence of tumor neoantigens.

Tumors with high TMB, such as melanoma and NSCLC, present an elevated production of neoantigens, which are mutant proteins generated by a variety of non-synonymous genetic alterations of tumor cell genomes [14,17]. When processed within the tumor cell and presented by the major histocompatibility complex (MHC) molecules, neoantigens can be captured and recognized by specific T cell receptors (TCR) via TCR/peptide/MHC interactions [18] (Figure 1). These neoantigen-specific T cell clones can be further reactivated by monoclonal antibodies to avoid immune escape and reinforce the host anti-tumor immune response [19]. Accordingly, TCR repertoire study allows a more accurate approach and opens a new possibility for a more selective and effective biomarker assessment.

In $\alpha\beta$ T cells, most of the TCR diversity is contained within the third complementarity-determining region (CDR3) of the α (TCR- α) and β (TCR- β) chains, the TCR- β being more diverse than the TCR- α [20]. The specificity and diversity of CDR3 are generated by random recombination of the variable (V), diversity (D), and joining (J) gene segments (Figure 1) [21]. When a T cell is activated and clonally expanded, all the cells of the clonal lineage express the same CDR3 [22]. Nonetheless, limited reports correlating TCR- β profiling response of immunotherapy have been published and, thereby, more comprehensive studies are required to confirm TCR- β diversity as an immuno-oncology biomarker.

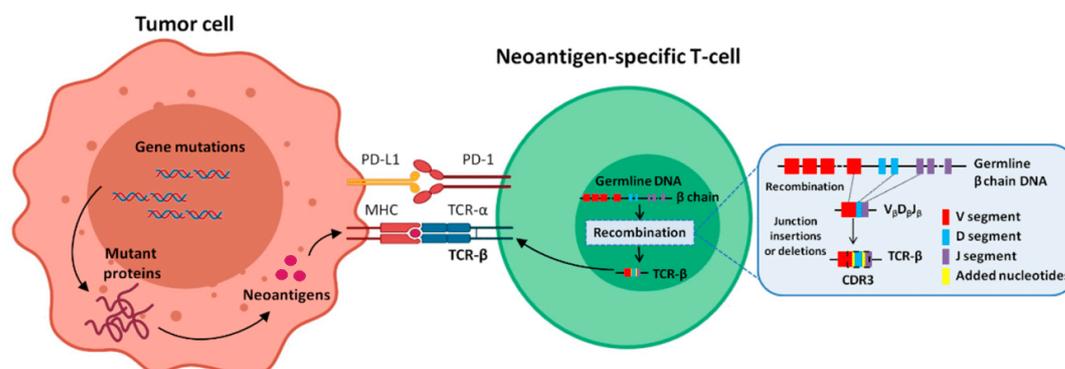


Figure 1. Relationship between tumor cell and neoantigen-specific T-cell. On one hand, tumor cells with high tumor mutational burden (TMB) produce an elevated neoantigen load. The neoantigens are processed within the tumor cell, presented by the major histocompatibility complex (MHC) molecule, and recognized by a neoantigen-specific T cell receptor (TCR). On the other hand, the TCR is represented on the T cell surface, consisting of a heterodimeric protein comprising two chains: α (TCR- α) and β (TCR- β). The highly variable complementarity determining region 3 (CDR3) of TCR- β is encoded at the gene level, in the variable (V), diversity (D), and joining (J) segments. During somatic diversification, one of each segment is randomly combined, and further diversity is introduced through insertions and/or deletions of added nucleotides. CDR3 is the main region responsible for recognizing processed antigens.

More recently, the development of next-generation sequencing (NGS) methods has facilitated the characterization of TCR- β repertoire in different solid tumor types [23]. Nonetheless, in NSCLC, the knowledge of the impact of the immune repertoire in the context of immune-based therapies was focused on the TCR sequencing in tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) [24–27]. Intratumoral heterogeneity has been observed in TCR clonality of CD4+ and CD8+ TILs across different regions of the same tumor, which may be the result of spatial and temporal diversity of neoantigens during lung cancer evolution [28–30]. Therefore, in order to dynamically track changes in tumor immune environment, alternative approaches are required. Liquid biopsy based on minimally invasive samples, such as peripheral blood, is a potential tool to solve the lack of tumor, and to better recapitulate tumor heterogeneity and plasticity. In addition, this approach with low failure rate usually requires short processing time and is less expensive [31]. Moreover, it has been proposed that the blood-based biomarkers, such as absolute lymphocyte count (ALC), neutrophil-lymphocyte ratio (NLR), etc., can show prognostic and predictive significance in lung cancer patients, but not prospectively validated [32,33]. In this regard, we think that an in-depth analysis of the T cell repertoire in the peripheral blood could be a rich source to unravel the dynamic behavior of the immune compartment during the course of immunotherapy.

In this study, we investigated the TCR- β repertoire at pretreatment (PRE) and first response assessment (FR) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to predict clinical outcomes in advanced NSCLC patients treated with first-line pembrolizumab by means of a minimally invasive approach. Our results further support that sequencing of circulating TCR- β CDR3 may be used as a biomarker of response and the presence and frequency of certain clonotypes might predict increased survival to anti-PD-1 therapy.

2. Materials and Methods

2.1. Patients

Between May 2019 and September 2020, a total of 33 advanced NSCLC patients treated with first-line pembrolizumab in monotherapy (200 mg every 21 days; $n = 24$) or in combination with chemotherapy (pembrolizumab 200 mg, cisplatin 130 mg, pemetrexed 200 mg, every 21 days; $n = 9$) were enrolled in this study. Patients with autoimmune disease or AIDs were excluded from the study. Demographic and clinicopathological

characteristics for all patients were collected. Follow-up was performed according to the institutional standard for advanced NSCLC patients treated with ICB.

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the ethical review board of the General University Hospital of Valencia. All patients provided written informed consent for sample acquisition for research purposes.

2.2. Sample Collection and Processing

Peripheral blood was collected in EDTA-containing tubes at baseline (PRE), prior to the first administration of pembrolizumab for all patients. One additional blood sample from 19 patients treated with pembrolizumab monotherapy was obtained at first response assessment (FR). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from whole blood using Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and stored in RNeasy Lysis Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at -80°C until further processing. Total RNA was isolated from PBMCs using the MagMAX mirVana Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific) and quantified through the Qubit RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). The Agilent RNA 6000 Pico Assay (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was used to determine RNA integrity numbers (RIN) in the Agilent 2100 Bioanalyzer. A RIN value greater or equal to 7 is recommended to follow subsequent TCR- β sequencing.

2.3. Library Preparation and TCR- β Sequencing

Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 25 ng of isolated RNA, using the SuperScript VILO cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific). TCR- β CDR3 libraries were prepared from 25 ng cDNA of each sample with the Oncomine TCR Beta-SR (RNA) Assays (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Eight libraries of 25 pM were combined and multiplexed per Ion 530TM Chip using the Ion ChefTM instrument and sequenced on Ion GeneStudio S5TM Series (Thermo Fisher Scientific). Matched PRE and FR samples were always sequenced in the same run.

2.4. Sequencing Analysis

More than 1 million raw sequencing reads were obtained with a length of around 80 base pairs (bp). After filtering the non-productive and off-target or low-quality reads, 50% or more total productive reads (productive and rescued productive) were used to identify the TCR- β CDR3 clones, according to the ImMunoGeneTics (IMGT) V, D, and J-gene reference using Ion Reporter software version 5.10 (Thermo Fisher Scientific).

T cell repertoire metrics were reported using several pre-calculated outputs, including richness, evenness, convergence, and V-gene (TRBV) and J-gene (TRBJ) usage frequencies. Richness was determined as the number of unique TCR- β CDR3 sequences [34]. Evenness, also known as the normalized diversity, was calculated as the following Equation (1):

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

where p_i indicates the frequency of the i^{th} clone and R indicates the total number of clones. Evenness accounted for both richness and the distribution inequality of the TCR- β CDR3 sequences present in each sample. Evenness values ranged from 0 to 1; the lower the evenness, the more uneven or more clonality the TCR clones distribution [35]. Evenness is the inverse of clonality (calculated as 1-evenness), thus lower evenness typically means higher clonality [36]. TCR convergence was defined as the aggregate frequency of clonotypes that are identical in amino acid space but different in nucleotide space [37]. A change in each index was defined as the logarithm of the index ratio between the two time points in base 10 ($\log_{10}(\text{FR}/\text{PRE})$). A $\log_{10}(\text{FR}/\text{PRE})$ greater than 0 represents the increased index from PRE to FR.

TCR- β repertoire similarity between PRE and FR samples was determined using the Jaccard index, which was calculated as the total number of shared clones divided by the total number of unique clones across two samples; this index ranged from 0 to 1, with 0 and 1 representing minimal and maximal similarity, respectively [38].

2.5. Therapeutic Responses Evaluation

The objective response rate (ORR) was evaluated using the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors version 1.1 (RECIST 1.1) [39] and was defined as the proportion of patients achieving complete (CR) or partial response (PR), stable disease (SD), and progressive disease (PD). The RECIST 1.1 quantification of response was used to assign patient designation as durable clinical benefit (DCB; CR, PR, or SD lasting over 6 months) and non-DCB (PD within 6 months after treatment start).

Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were defined as the interval from the start of anti-PD-1 treatment to the endpoint (objective disease progression and death, respectively) or last follow-up.

2.6. Statistical Analysis

In order to compare paired PRE and FR samples, the Wilcoxon signed-rank test was used. Comparisons between any two groups were analyzed using the Mann–Whitney test and Fisher’s exact test for continuous and categorical variables, respectively. Graphs comparing metrics across groups show the median and the interquartile range, assuming non-normally distributed data. Correlation between continuous variables was assessed by the Spearman rank correlation test.

The Kaplan–Meier method was used to calculate survival rates (PFS and OS). Log-rank tests were used for comparisons between the two groups. Hazard ratio (HR) and 95% confidence interval (95%CI) were estimated using the univariate Cox proportional hazards regression model.

All statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software version 24.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) and GraphPad Prism 9 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Two-sided *p*-values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Patient Clinicopathological Characteristics

Clinical and pathological information including age, gender, stage of disease, histology, PD-L1 expression, and treatment scheme of the study cohort are summarized in Table 1. The majority of the patients in this cohort were smokers (75.8%) and males (72.7%). None of the patients harbored targetable drivers approved by European Medicines Agency (EMA). According to current guidelines, PD-L1 expression $\geq 50\%$ was present in tumor samples from the 24 patients treated with pembrolizumab in monotherapy, while six patients treated with pembrolizumab plus chemotherapy presented PD-L1 expression lower than 1%.

The ORR was 36.4% (12/33), 22 patients presented DCB (12 PR and 10 SD), whereas the remaining 11 patients non-DCB. The median duration of follow-up was 12.7 months (range: 3.1–21.7 months). Detailed patient characteristics and outcomes are shown in Table S1.

Table 1. Clinicopathological characteristics of the patients included in the study.

Clinicopathological Characteristics	n = 33	%
Age (years)(median, range)	65 (46–87)	
Sex		
Male	24	72.7
Female	9	27.3
Smoking status		
Smoker	25	75.8
Former smoker	6	18.2
Never smoker	2	6.1
Histological subtype		
Adenocarcinoma	24	72.7
Squamous carcinoma	4	12.1
Large cell carcinoma	1	3.0
Poorly differentiated	4	12.1
Stage classification by TNM¹ standard		
IIIA ²	2	6.1
IIIB	3	9.1
IIIC	1	3.0
IVA	16	48.5
IVB	11	33.3
PD-L1 TPS³		
<1%	6	18.2
1–49%	3	9.1
≥50%	24	72.7
First-line treatment		
Pembrolizumab monotherapy	24	72.7
Pembrolizumab-Cisplatin-Pemetrexed	9	27.3

¹ TNM: tumor–node–metastasis staging. ² IIIA: patients not candidates for surgery, radiation, or chemotherapy. ³ PD-L1 expression was assessed by tumor proportion scores (TPS) and reported by using a three cut-point system: TPS < 1%, TPS 1%–49%, and TPS ≥ 50%.

3.2. Sequencing Data

RNA was isolated from a total of 52 PBMCs samples, the median value of the RNA integrity number (RIN) obtained was 9.3 (7.0–10.0), thus all the samples were considered of good quality to proceed with library preparation and sequencing.

Sequencing data across the CDR3 region of TCR-β of the 52 libraries resulted in a mean of 1,431,317 (552,776–2,427,120) total productive reads (productive plus rescued reads) per sample, with an average length of 86 base pairs. Only PRE and FR samples with ≥50% total productive reads were used for TCR data analysis. No difference in the total number of reads between PRE and FR samples was observed ($p = 0.376$; Table S3). Detailed information of sequencing metrics for each sample is provided in Figure S1 and Table S2.

Next, we evaluated the characteristics of the TCR-β repertoire by means of different indexes, such as: richness (determines the number of unique TCR-β CDR3 sequences), evenness (measurement of the similarity of clone sizes), convergence (frequency of clonotypes that are identical in amino acid space, but different in nucleotide space), and Jaccard similarity index (ratio of the intersection to the union of the set of clones in each pair of PRE and FR samples) (see detailed index information in Table S2). Similar richness ($p = 0.658$), evenness ($p = 0.809$), and convergence ($p = 0.107$) of the TCR-β repertoire were observed between PRE and FR samples (Table S3).

3.3. Association of TCR-β Repertoire with Clinicopathological Characteristics

To assess the influence of the patients' clinicopathological characteristics on the TCR-β repertoire, we performed correlations between PRE indexes and the clinical variables. Of note, TCR-β richness was significantly lower ($p = 0.040$) in smokers compared with

non-smokers (including former and never smokers) (Figure 2). No significant associations were found with the rest of the clinicopathological characteristics (age, histology, stage of disease, tumor size, number of metastatic localizations, and PD-L1 expression) analyzed at baseline (Table S4).

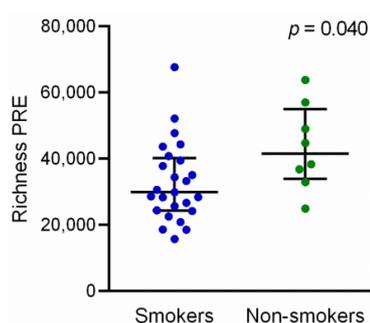


Figure 2. Peripheral TCR- β clone richness stratified by smoking status in pretreated NSCLC patients. *P*-value was obtained using the Mann–Whitney test. Error bars represent the interquartile range with a line at the median. Each dot represents a patient. Non-smokers: never smokers + former smokers. PRE: pretreatment.

3.4. Dynamic Monitoring of TCR- β Repertoire during Immunotherapy Treatment Provides Prognostic and Predictive Information

We further investigated the correlation of PRE TCR- β repertoire characteristics with clinical outcomes to anti-PD-1 treatment and no significant associations were observed (Figures S2 and S3). However, we found a trend toward longer PFS and OS among patients with lower richness and higher evenness at baseline (Figure S3).

Additionally, the changes in the TCR- β repertoire of 19 paired PRE and FR collected samples from patients treated with pembrolizumab monotherapy were analyzed and correlated with clinical outcomes. Regarding the dynamics of richness index during treatment, an increase in this parameter was found in 10 patients with DCB (10/14, 71.4%) and only in one non-DCB patient (P8) (1/5, 20%; Figure 3a). Moreover, the number of unique TCR clones was significantly increased after the introduction of anti-PD-1 therapy in patients with DCB versus non-DCB ($p = 0.046$; Figure 3b and Table S5). In this line, we found that patients with increased TCR richness (FR compared to PRE) showed improved PFS (HR: 0.143, 95%CI: 0.028–0.727, log-rank $p = 0.007$; Figure 4a) and OS (HR: 0.152, 95%CI: 0.017–1.361, log-rank $p = 0.05$; Figure 4b).

Considering these observations, we questioned if the TCR richness increase was linked to the dynamics of the absolute lymphocytes count (ALC) in circulation. Among 11 patients whose richness increased during treatment, we identified ix patients (P2, P8, P9, P11, P16, and P17) with an increase of ALC; nevertheless, the other five patients (P5, P6, P10, P15, and P19) presented a decrease in ALC. The correlation analysis showed no significant correlation between ALC and TCR richness changes (Figure S4).

Peripheral TCR- β evenness changes were small in magnitude during immunotherapy and no dynamic pattern in terms of the TCR convergence was observed in NSCLC patients' cohort (Figures S5 and S6). However, the three patients (P2, P9, and P15) who showed a dramatic increase of convergence (\log_{10} (FR/PRE) = 0.41, 0.28, and 0.53, respectively) exhibited PR to ICB therapy.

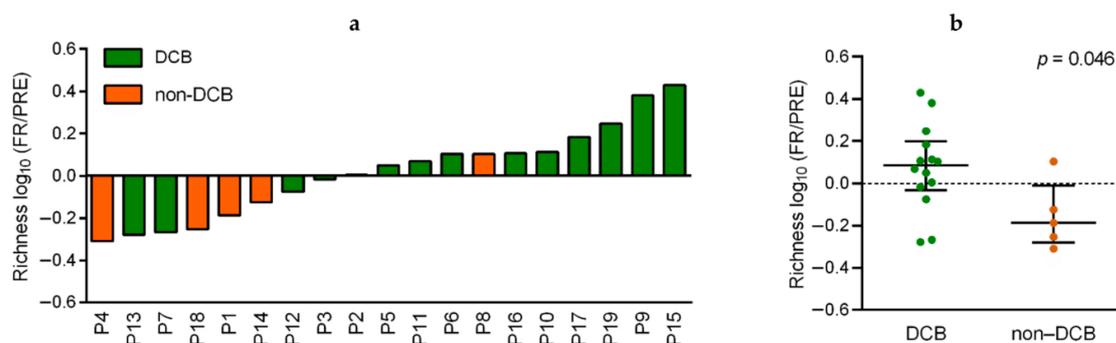


Figure 3. Correlation of dynamic richness of TCR- β repertoire in peripheral blood with response in anti-PD-1 treated NSCLC patients. (a) Richness \log_{10} (FR/PRE) between pretreatment (PRE) and first response assessment (FR) in patients with durable clinical benefit (DCB; in green) and non-durable clinical benefit (non-DCB; in orange). Each column represents a patient. (b) Comparison of richness \log_{10} (FR/PRE) between patients with DCB and non-DCB. P -value was obtained using the Mann–Whitney test. Error bars represent the interquartile range with a line at the median. Each dot represents a patient.

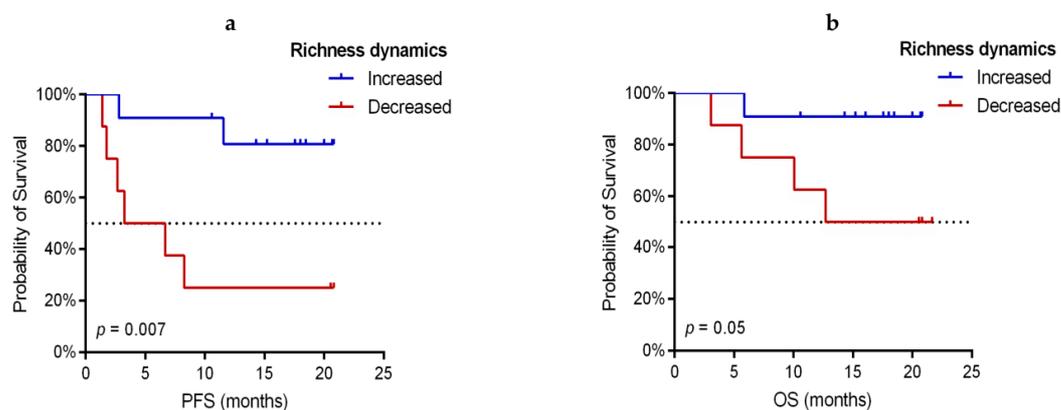


Figure 4. Kaplan–Meier survival curves according to TCR- β richness dynamics in anti-PD-1 treated NSCLC patients. (a) Progression-free survival (PFS) stratified in increased ($n = 11$) vs. decreased richness ($n = 8$). (b) Overall survival (OS) stratified in increased ($n = 11$) vs. decreased richness ($n = 8$). P -values were obtained using the log-rank test.

3.5. Association of TCR- β Clones Similarity before and during Immunotherapy Treatment with Predictive and Prognostic Variables

The Jaccard index was used to evaluate the similarity of CDR3 sequences between PRE and FR samples for 19 patients treated with pembrolizumab. Compared to non-DCB patients, patients who exhibited DCB showed a trend towards increased Jaccard similarity, i.e., greater proportion of shared CDR3 sequences between PRE and FR samples ($p = 0.052$; Figure S7 and Table S5). Interestingly, 10 of 14 (71.4%) patients who exhibited DCB presented a Jaccard index greater or equal to the median (median = 0.0605, defined as “high Jaccard”), whereas none of the non-DCB patients showed high Jaccard index ($p = 0.011$) (Figure 5a). Furthermore, PFS was significantly longer in patients with high Jaccard index (HR: 0.183, 95%CI: 0.037–0.921, log-rank $p = 0.021$; Figure 5b) and a similar trend was observed in OS (HR: 0.173, 95%CI: 0.019–1.559, log-rank $p = 0.077$; Figure S8).

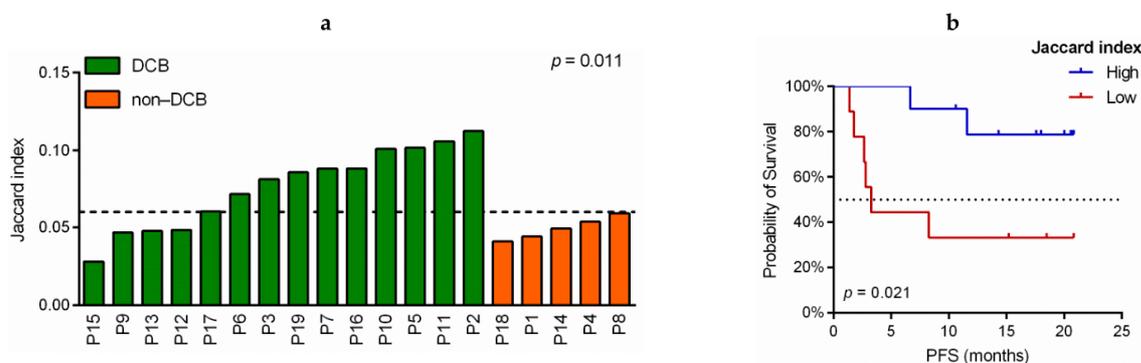


Figure 5. Correlation of TCR- β similarities before and during the anti-PD-1 treatment with response and prognostic variables in NSCLC patients. (a) Jaccard index in patients with durable clinical benefit (DCB; in green) and non-durable clinical benefit (non-DCB; in orange). p -value was obtained using the Fisher's exact test. Each column represents a patient. (b) Kaplan–Meier progression-free survival (PFS) curves according to the Jaccard similarity index. Jaccard similarity index was calculated as the total number of shared clones divided by the total number of unique clones across PRE and FR samples of the same patient and the median = 0.0605 was used as the cutoff value to define high (blue line) and low (red line) groups. p -value was obtained using the log-rank test.

3.6. Implication of V and J-Gene of Peripheral TCR- β Repertoire

The V and J-gene usage was analyzed in PRE and FR peripheral blood samples to investigate the distribution of the V and J segments, aside from the correlation of dominant use of certain segments with follow-up. The NGS assay detected 55 distinct V-gene segments and 13 distinct J-gene segments. Similar TRBV and TRBJ gene usage of the TCR- β repertoire in 33 PRE and 19 FR samples was observed through heatmap analyses (Figure S9). Based on the frequencies of TRBV usage, the top three most abundant V segments in PRE samples were TRBV20-1 (9.14%), TRBV7-2 (6.28%), and TRBV19 (5.19%) (Figure 6a). While TRBV20-1 (9.02%), TRBV7-2 (5.33%), and TRBV12-3 (5.31%) presented the highest frequencies at first response assessment (Figure 6b). Among J-gene segments, TRBJ2-3 was the most frequent in PRE (13.17%; Figure 6c) and TRBJ1-1 in FR samples (13.05%; Figure 6d).

Afterwards, we compared the frequency of clonotypes between DCB and non-DCB patients (Table S5). Specifically, TRBV20-1, as the most abundant segment V, was more abundant in DCB patients at baseline ($p = 0.027$; Figure 7a). Among others V segments with relatively low usage, baseline TRBV23-1 was more frequent in patients with DCB ($p = 0.043$) and TRBV6-5 was more frequent in non-DCB ($p = 0.013$). In the case of FR samples, patients with DCB showed higher frequency of TRBV11-1 ($p = 0.033$), while patients with non-DCB showed higher frequencies of TRBV6-4 ($p = 0.033$) and TRBV6-5 ($p = 0.010$) (Figure 7a). According to J segments usage, TRBJ1-2 PRE was more enriched in non-DCB ($p = 0.047$), whereas TRBV2-4 PRE was significantly enriched in patients with DCB ($p = 0.032$) (Figure 7b). In FR samples, no significant differences in the usage of TRBJ segments were observed.

When categorizing patients as having higher (\geq median) or lower ($<$ median) frequencies of TRBV segments usage, TRBV6-5 and TRBV20-1 showed a significant correlation with PFS and OS. High TRBV6-5 PRE was associated with a worse PFS (HR: 4.770, 95%CI: 1.524–14.928, log-rank $p = 0.003$; Figure 8a) and OS (HR: 7.678, 95%CI: 1.662–35.458, log-rank $p = 0.002$; Figure 8b), whereas patients with high TRBV20-1 at baseline showed a significant increase in PFS (HR: 0.314, 95%CI: 0.108–0.914, log-rank $p = 0.025$; Figure 8c) and OS (HR: 0.268, 95%CI: 0.072–0.995, log-rank $p = 0.035$; Figure 8d).

It was observed that all patients with high TRBV20-1 PRE maintained this status without dramatic changes at the time of FR assessment. When analyzing the prognostic significance of TRBV20-1 in FR samples, its high usage was also positively correlated with

improved PFS (HR: 0.117, 95%CI: 0.014-0.955, log-rank $p = 0.016$; Figure 8e) and OS (HR: 0.119, 95%CI: 0.020-0.692, log-rank $p = 0.018$; Figure 8f).

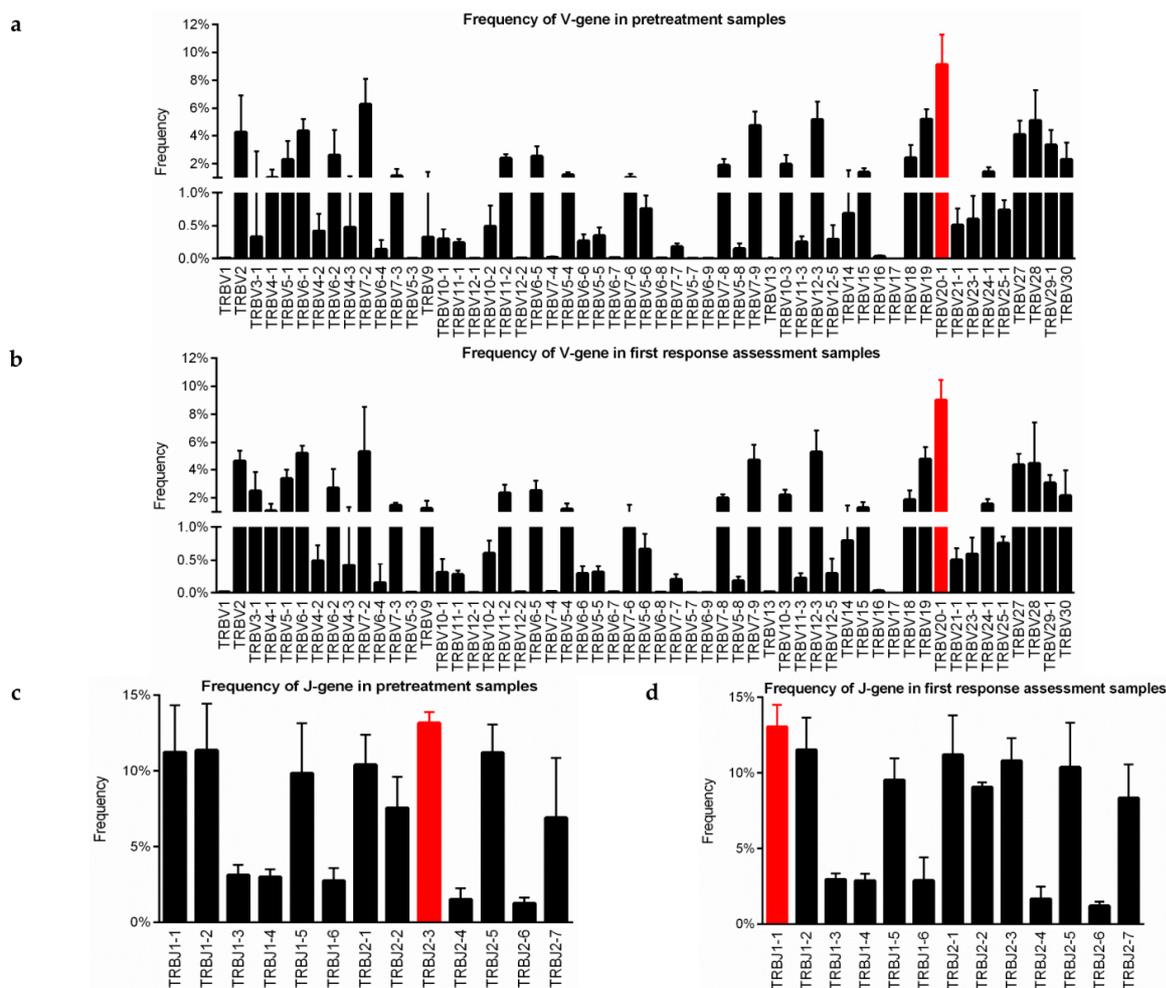


Figure 6. V and J-gene usage in anti-PD-1 treated NSCLC patients. (a,b) Frequency of V-gene in pretreatment and first response assessment samples. (c,d) Frequency of J-gene in pretreatment and first response assessment samples. The height of each column represents the median of the frequency and the error bars depict the interquartile range. The red columns correspond to V and J segments with the highest frequencies for pretreatment and first response assessment samples.

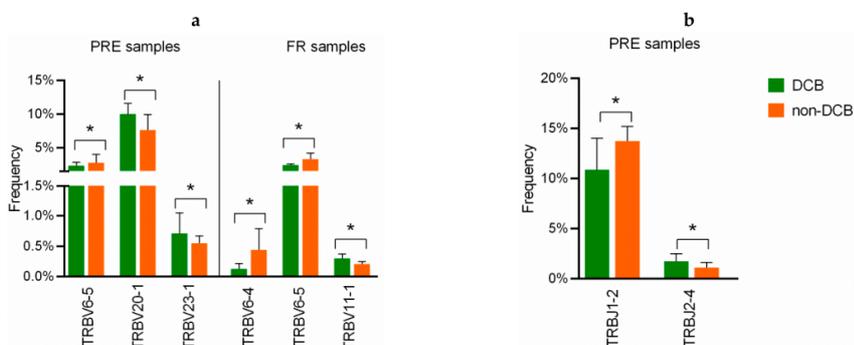


Figure 7. Comparison of V and J-gene usage between anti-PD-1 treated NSCLC patients with DCB vs. non-DCB. (a) V-gene usage in pretreatment (PRE) and first response assessment (FR) samples. (b) J-gene usage in PRE samples. Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney test. The height of each column represents the median of the frequency and the error bars depict the interquartile range. DCB: durable clinical benefit, in green; non-DCB: non-durable clinical benefit, in orange. * $p < 0.05$.

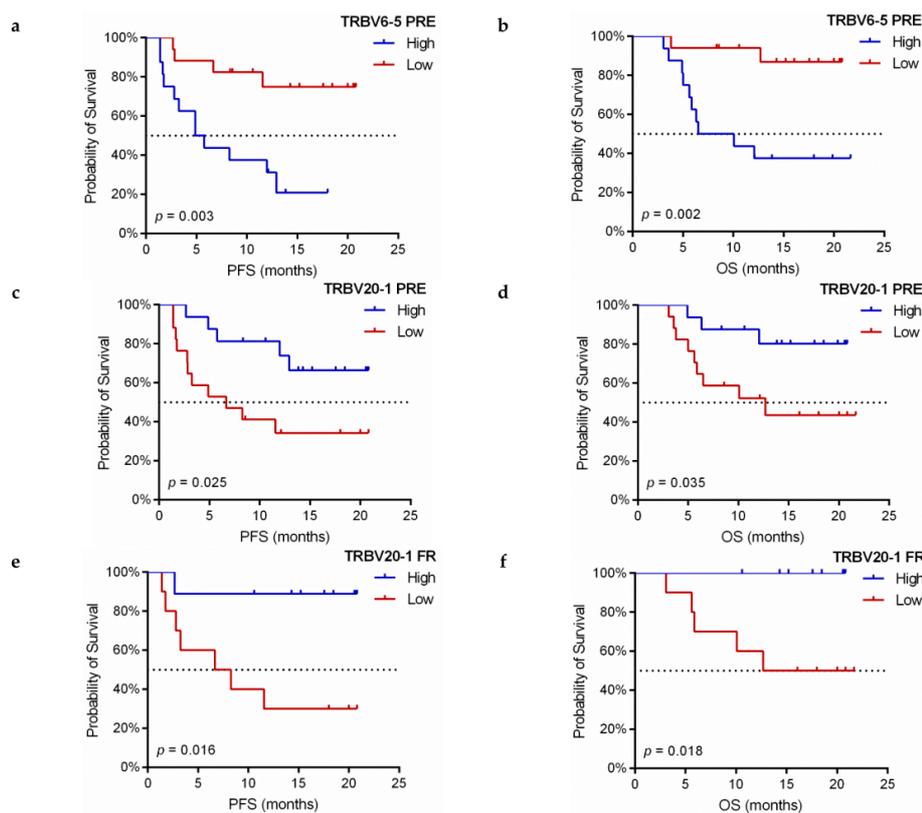


Figure 8. Kaplan–Meier survival curves according to V-gene usage in anti-PD-1 treated NSCLC patients. (a,b) Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) curves in terms of PRE TRBV6-5 frequency. (c,d) PFS and OS curves in terms of PRE TRBV20-1 frequency. (e,f) PFS and OS curves in terms of FR TRBV20-1 frequency. The median frequency values were used as cutoff values (2.53% for PRE TRBV6-5, 9.14% for PRE TRBV20-1, and 9.02% for FR TRBV20-1, respectively). PRE: pretreatment, FR: first response assessment, p -values were obtained using the log-rank test.

4. Discussion

Despite the success of ICBs based therapies in NSCLC, there is a need for the development of new biomarkers for patient selection. Several tumor-based markers, such as PD-L1 expression, TMB, or MSI, have been correlated with the response to anti-PD-1 antibodies; however, there is still an urge for better identification of patients more likely to respond.

There is evidence that the analysis of TCR profiles provides predictive information of response to ICB [23]. Previous studies have analyzed the TCR- β repertoire at tumor microenvironment, showing that higher intratumoral clonality and the peripheral expansion of dominant tumor-resident T cell clones following ICB therapy are associated with better clinical outcomes [24–27]. However, in a high percentage of advanced lung cancer patients, tumor samples are completely exhausted during diagnostic procedures limiting further additional studies. In this regard, the development of TCR-based biomarkers in liquid biopsy may be an option in advanced NSCLC. Nonetheless, results from limited reports focused on the characterization of peripheral blood TCR repertoire and response prediction are variable, perhaps due to the small sample size, differences in tumor types, sequencing methods or the type of ICB used [25,27,37,40]. Hence, in this study we comprehensively analyzed the TCR- β repertoire in PBMC obtained at two different time points (PRE and FR) from a cohort of 33 advanced NSCLC patients treated in first-line with pembrolizumab, an anti-PD-1 blocker, in monotherapy or in combination with chemotherapy.

We characterized the baseline TCR- β repertoire and found that the number of circulating TCR- β clones significantly decreased in smokers when compared to non-smokers. Although smokers have, in general, a higher TMB, which may further improve the ICB efficacy [14], non-smokers still have longer OS than smokers [41]. Hernandez et al. have demonstrated that smoking can inhibit T cell proliferation by inducing apoptosis, linked to reactive oxygen and nitrogen species [42]. Our results further confirm the adverse effect of smoking on the immune system.

Here, we report that an increase in the TCR- β repertoire richness was associated with better clinical outcomes, suggesting that the increase in the number of T cell clones in peripheral blood may reflect a pharmacodynamic effect of anti-PD-1 antibody therapy. In agreement with our findings, previous studies in melanoma demonstrated that ICBs therapy increased the peripheral blood TCR- β amplitude as reflected in the number of unique TCR clones by high-throughput sequencing in TCR- β chain from PBMCs samples [34,43]; as a consequence, this amplified repertoire may offer more opportunities to recognize tumor neoantigens, leading to improved therapeutic responses.

Our study also revealed that a similar distribution of TCR- β clones between PRE and FR samples was associated with DCB and better PFS. We hypothesized that the pre-existing anti-tumor T cell populations should be maintained during ICB therapy to control tumor progression. In addition to the maintenance of these T cell populations, the enlarged T cell repertoire during ICB therapy could result in the activation of additional neoantigen-specific T cell clones, rendering these patients more likely to respond to immune-based therapies. Similarly, a study in NSCLC patients treated with anti-PD-1/PD-L1 by sequencing peripheral PD-1+ CD8+ T cells TCR- β CDR3 region with NGS showed that higher repertoire similarities between pretreatment and 4–6 weeks post-treatment samples were significantly associated with better clinical outcomes [40]. Additionally, Liu et al. demonstrated that higher similarities in peripheral TCR clones before and after conventional anti-cancer treatments (such as chemotherapy, radiotherapy, targeted therapy, etc.) were associated with better clinical results through profiling the peripheral blood TCR- β CDR3 repertoire via NGS in advanced NSCLC patients [44]. It is generally considered that PD-1 plays a crucial role in regulating immune tolerance and PD-1 blockade therapy can reinvigorate pre-existing TILs that are reactive to neoantigens on tumor cells [45]. However, as discussed by Yost et al., there is increasing evidence that the immune response to anti-PD-1 may originate beyond the tumor microenvironment and rely on peripheral T cell recruitment [46]. Our findings support this argument, making an important contribution to cancer immunotherapy.

The diversified TCR repertoire is generated through somatic recombination of the VDJ gene segments. In our study, high usage of TRBV6-5 was associated with disease progression and a poor prognosis. One possible explanation for the negative prognostic role of TRBV6-5 is that the T-cells containing this segment may not be activated by tumor-associated antigens, and cannot recognize neoantigens. This hypothesis agreed with a study concerning deep TCR- β sequencing in isolated T cells from tumor tissue of patients with prostate cancer, in which TRBV6-5 was specific to the adjacent tumor samples and could not be detected in the tumor tissue [47].

Finally, our data revealed that TRBV20-1 was the most abundant V segment in our cohort. Moreover, the presence of higher frequencies of these TCR clones in peripheral blood predicts survival to anti-PD-1 therapy. There is limited information regarding the prognostic or predictive value of V and J-gene usage in circulating T cells in this clinical context, and to our knowledge, none has been found in NSCLC to date. In line with our results, TRBV20-1 has been reported previously as one of the most used V-gene in tumor-infiltrating T lymphocytes in several solid tumors [48]. Particularly, in lung cancer, Wang et al. demonstrated that the TRBV20-1 usage was higher in tumor compared with normal lung tissues by sequencing the TCR- β CDR3 region [24]. These data align with our results suggesting that the T cell clones containing TRBV20-1 may recognize tumor neoantigens, and should be maintained when undergoing ICB treatment to control the growth of tumor cells. Thus, we propose that analysis of circulating TRBV20-1 usage may be predictive of increased survival in anti-PD-1 treated NSCLC patients.

Although there are some limitations in this study, mainly related to the sample size, which could limit the generalization of our findings, and the lack of an external validation set, the results presented here support that characterization of blood TCR repertoire provides valuable clinical information using a minimally invasive approach. Moreover, analysis and comparison of paired blood and tumor tissue samples should be performed in subsequent extensive cohorts, in order to identify accurately the functional anti-tumor T cells. Besides, the correlation and possible combination with other validated biomarkers, such as TILs, PD-L1 expression on tumor-infiltrating immune cells and TMB, should also be analyzed to provide a better prognostic signature of immunotherapy in lung cancer. Nevertheless, the analyses presented here demonstrate the feasibility and clinical relevance of sequencing the CDR3 region of TCR- β chain to characterize the circulating T cell repertoire, enhanced by the decrease of sequencing costs and the easy access to blood samples rather than tumor tissue samples.

5. Conclusions

Altogether, our results show that TCR- β based biomarkers are useful, not only to assess the immune response, but also to predict the clinical outcomes for immunotherapy in NSCLC patients. Furthermore, the TRBV20-1 usage might be applied as a novel biomarker, facilitating patient selection, in NSCLC patients treated with pembrolizumab.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13122950/s1>, Figure S1: Distribution of reads obtained by TCR- β sequencing, Figure S2: Correlation between peripheral TCR- β repertoire features and response to anti-PD-1 in pretreated NSCLC patients, Figure S3: Kaplan–Meier survival curves according to baseline TCR- β features in pretreated NSCLC patients, Figure S4: Correlations between changes in absolute lymphocyte count (ALC) and changes in TCR richness in anti-PD-1 treated NSCLC patients, Figure S5: Correlation of dynamic evenness and convergence of TCR- β repertoire in peripheral blood with response in anti-PD-1 treated NSCLC patients, Figure S6: Kaplan–Meier survival curves according to TCR- β evenness and convergence dynamics in anti-PD-1 treated NSCLC patients, Figure S7: Correlation of TCR- β clones similarity before and during the anti-PD-1 treatment with response in NSCLC patients, Figure S8: Kaplan–Meier overall survival (OS) curves according to the Jaccard similarity index, Figure S9: Usage of V and J-gene segments in pretreatment and first response assessment samples, Table S1: Detailed clinicopathological characteristics of the patients included in the study, Table S2: Sample characteristics and TCR- β CDR3 sequencing information of the patients included in

the study, Table S3: Comparison of TCR- β repertoire characteristics between PRE and FR samples, Table S4: Correlation of basal TCR- β repertoire characteristics with clinicopathological variables in pretreated NSCLC patients, Table S5: Correlation of TCR- β repertoire characteristics with response in NSCLC patients.

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

Funding: This research was funded by Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer, grant number CB16-12-00350, and Instituto de Salud Carlos III, grant number PI18/00266.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of CONSORCIO HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE VALENCIA (June 29, 2017).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in this article and attached supplementary files.

Acknowledgments: We would like to thank the Arnal Planelles Foundation and AMACMA for supporting our work. The authors N.D. and F.Z. are funded by the China Scholarship Council (CSC) from the Ministry of Education of P. R. China. The author A.M.-M is recipient of a PhD scholarship from Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) Scientific Foundation and Junta Provincial Asociada de Valencia AECC.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 7–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Brahmer, J.; Reckamp, K.L.; Baas, P.; Crinò, L.; Eberhardt, W.E.E.; Poddubskaia, E.; Antonia, S.; Pluzanski, A.; Vokes, E.E.; Holgado, E.; et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 123–135. [[CrossRef](#)]
4. Gandhi, L.; Rodríguez-Abreu, D.; Gadgeel, S.; Esteban, E.; Felip, E.; De Angelis, F.; Domine, M.; Clingan, P.; Hochmair, M.J.; Powell, S.F.; et al. Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 2078–2092. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Socinski, M.A.; Jotte, R.M.; Cappuzzo, F.; Orlandi, F.; Stroyakovskiy, D.; Nogami, N.; Rodríguez-Abreu, D.; Moro-Sibilot, D.; Thomas, C.A.; Barlesi, F.; et al. Atezolizumab for first-line treatment of metastatic nonsquamous NSCLC. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 2288–2301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Sacher, A.G.; Gandhi, L. Biomarkers for the clinical use of PD-1/PD-L1 inhibitors in non-small-cell lung cancer: A review. *JAMA Oncol.* **2016**, *2*, 1217–1222. [[CrossRef](#)]
7. Grigg, C.; Rizvi, N.A. PD-L1 biomarker testing for non-small cell lung cancer: Truth or fiction? *J. Immunother. Cancer* **2016**, *4*, 48. [[CrossRef](#)]
8. Gibney, G.T.; Weiner, L.M.; Atkins, M.B. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, e542–e551. [[CrossRef](#)]
9. Marcus, L.; Lemery, S.J.; Keegan, P.; Pazdur, R. FDA approval summary: Pembrolizumab for the treatment of microsatellite instability-high solid tumors. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 3753–3758. [[CrossRef](#)]
10. Subbiah, V.; Solit, D.B.; Chan, T.A.; Kurzrock, R. The FDA approval of pembrolizumab for adult and pediatric patients with tumor mutational burden (TMB) ≥ 10 : A decision centered on empowering patients and their physicians. *Ann. Oncol.* **2020**, *31*, 1115–1118. [[CrossRef](#)]
11. Bai, R.; Lv, Z.; Xu, D.; Cui, J. Predictive biomarkers for cancer immunotherapy with immune checkpoint inhibitors. *Biomark. Res.* **2020**, *8*, 34. [[CrossRef](#)]
12. Galvano, A.; Gristina, V.; Malapelle, U.; Pisapia, P.; Pepe, F.; Barraco, N.; Castiglia, M.; Perez, A.; Rolfo, C.; Troncione, G.; et al. The prognostic impact of tumor mutational burden (TMB) in the first-line management of advanced non-oncogene addicted non-small-cell lung cancer (NSCLC): A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *ESMO Open* **2021**, *6*, 100124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Yarchoan, M.; Hopkins, A.; Jaffee, E.M. Tumor mutational burden and response rate to PD-1 inhibition. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 2500–2501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Rizvi, N.A.; Hellmann, M.D.; Snyder, A.; Kvistborg, P.; Makarov, V.; Havel, J.J.; Lee, W.; Yuan, J.; Wong, P.; Ho, T.S.; et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* **2015**, *348*, 124–128. [[CrossRef](#)]
15. Sesma, A.; Pardo, J.; Cruellas, M.; Gálvez, E.M.; Gascón, M.; Isla, D.; Martínez-Lostao, L.; Ocariz, M.; Paño, J.R.; Quílez, E.; et al. From tumor mutational burden to blood T cell receptor: Looking for the best predictive biomarker in lung cancer treated with immunotherapy. *Cancers* **2020**, *12*, 2974. [[CrossRef](#)]
16. Pepe, F.; Pisapia, P.; Gristina, V.; Rocco, D.; Micheli, M.; Micheli, P.; Iaccarino, A.; Tufano, R.; Gragnano, G.; Russo, G.; et al. Tumor mutational burden on cytological samples: A pilot study. *Cancer Cytopathol.* **2020**, *129*, 460–467. [[CrossRef](#)]
17. Alexandrov, L.B.; Nik-Zainal, S.; Wedge, D.C.; Aparicio, S.A.J.R.; Behjati, S.; Biankin, A.V.; Bignell, G.R.; Bolli, N.; Borg, A.; Børresen-Dale, A.L.; et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **2013**, *500*, 415–421. [[CrossRef](#)]
18. McKee, M.D.; Roszkowski, J.J.; Nishimura, M.I. T cell avidity and tumor recognition: Implications and therapeutic strategies. *J. Transl. Med.* **2005**, *3*, 35. [[CrossRef](#)]
19. Topalian, S.L.; Taube, J.M.; Anders, R.A.; Pardoll, D.M. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 275–287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Hodges, E.; Krishna, M.T.; Pickard, C.; Smith, J.L. Diagnostic role of tests for T cell receptor (TCR) genes. *J. Clin. Pathol.* **2003**, *56*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Gras, S.; Kjer-Nielsen, L.; Burrows, S.R.; McCluskey, J.; Rossjohn, J. T-cell receptor bias and immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **2008**, *20*, 119–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Turner, S.J.; Doherty, P.C.; McCluskey, J.; Rossjohn, J. Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, *6*, 883–894. [[CrossRef](#)]
23. Aversa, I.; Malanga, D.; Fiume, G.; Palmieri, C. Molecular T-cell repertoire analysis as source of prognostic and predictive biomarkers for checkpoint blockade immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2378. [[CrossRef](#)]
24. Wang, X.; Zhang, B.; Yang, Y.; Zhu, J.; Cheng, S.; Mao, Y.; Feng, L.; Xiao, T. Characterization of Distinct T Cell Receptor Repertoires in Tumor and Distant Non-tumor Tissues from Lung Cancer Patients. *Genom. Proteom. Bioinform.* **2019**, *17*, 287–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Zhang, J.; Ji, Z.; Caushi, J.X.; El Asmar, M.; Anagnostou, V.; Cottrell, T.R.; Chan, H.Y.; Suri, P.; Guo, H.; Merghoub, T.; et al. 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. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *26*, 1327–1337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Anagnostou, V.; Forde, P.M.; White, J.R.; Niknafs, N.; Hruban, C.; Naidoo, J.; Marrone, K.; Ashok Sivakumar, I.K.; Bruhm, D.C.; Rosner, S.; et al. Dynamics of Tumor and Immune Responses during Immune Checkpoint Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 1214–1225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Forde, P.M.; Chaft, J.E.; Smith, K.N.; Anagnostou, V.; Cottrell, T.R.; Hellmann, M.D.; Zahurak, M.; Yang, S.C.; Jones, D.R.; Broderick, S.; et al. Neoadjuvant PD-1 Blockade in Resectable Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 1976–1986. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Reuben, A.; Gittelman, R.; Gao, J.; Zhang, J.; Yusko, E.C.; Wu, C.-J.; Emerson, R.; Zhang, J.; Tipton, C.; Li, J.; et al. TCR Repertoire Intratumor Heterogeneity in Localized Lung Adenocarcinomas: An Association with Predicted Neoantigen Heterogeneity and Postsurgical Recurrence. *Cancer Discov.* **2017**, *7*, 1088–1097. [[CrossRef](#)]
29. Zhang, C.; Ding, H.; Huang, H.; Palashati, H.; Miao, Y.; Xiong, H.; Lu, Z. TCR repertoire intratumor heterogeneity of CD4+ and CD8+ T cells in centers and margins of localized lung adenocarcinomas. *Int. J. Cancer* **2019**, *144*, 818–827. [[CrossRef](#)]
30. De Bruin, E.C.; McGranahan, N.; Mitter, R.; Salm, M.; Wedge, D.C.; Yates, L.; Jamal-Hanjani, M.; Shafi, S.; Murugaesu, N.; Rowan, A.J.; et al. Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. *Science* **2014**, *346*, 251–256. [[CrossRef](#)]
31. Moreno, A.; Calabuig-Fariñas, S.; Obrador-Hevia, A.; Blasco, A.; Fernández-Díaz, A.; Sirera, R.; Camps, C.; Jantus-Lewintre, E. dPCR application in liquid biopsies: Divide and conquer. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2021**, *21*, 3–15. [[CrossRef](#)]
32. Karantanos, T.; Karanika, S.; Seth, B.; Gignac, G. The absolute lymphocyte count can predict the overall survival of patients with non-small cell lung cancer on nivolumab: A clinical study. *Clin. Transl. Oncol.* **2019**, *21*, 206–212. [[CrossRef](#)]
33. Galvano, A.; Peri, M.; Guarini, A.A.; Castiglia, M.; Grassadonia, A.; De Tursi, M.; Irtelli, L.; Rizzo, S.; Bertani, A.; Gristina, V.; et al. Analysis of systemic inflammatory biomarkers in neuroendocrine carcinomas of the lung: Prognostic and predictive significance of NLR, LDH, ALI, and LIPI score. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2020**, *12*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Robert, L.; Tsoi, J.; Wang, X.; Emerson, R.; Homet, B.; Chodon, T.; Mok, S.; Huang, R.R.; Cochran, A.J.; Comin-Anduix, B.; et al. CTLA4 blockade broadens the peripheral T-cell receptor repertoire. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 2424–2432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Pielou, E.C. Species-diversity and pattern-diversity in the study of ecological succession. *J. Theor. Biol.* **1966**, *10*, 370–383. [[CrossRef](#)]
36. Kirsch, I.; Vignali, M.; Robins, H. T-cell receptor profiling in cancer. *Mol. Oncol.* **2015**, *9*, 2063–2070. [[CrossRef](#)]
37. Looney, T.J.; Topacio-Hall, D.; Lowman, G.; Conroy, J.; Morrison, C.; Oh, D.; Fong, L.; Zhang, L. TCR Convergence in Individuals Treated With Immune Checkpoint Inhibition for Cancer. *Front. Immunol.* **2020**, *10*. [[CrossRef](#)]
38. Rempala, G.A.; Seweryn, M. Methods for diversity and overlap analysis in T-cell receptor populations. *J. Math. Biol.* **2013**, *67*, 1339–1368. [[CrossRef](#)]

39. Eisenhauer, E.A.; Therasse, P.; Bogaerts, J.; Schwartz, L.H.; Sargent, D.; Ford, R.; Dancey, J.; Arbuck, S.; Gwyther, S.; Mooney, M.; et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur. J. Cancer* **2009**, *45*, 228–247. [[CrossRef](#)]
40. Han, J.; Duan, J.; Bai, H.; Wang, Y.; Wan, R.; Wang, X.; Chen, S.; Tian, Y.; Wang, D.; Fei, K.; et al. TCR repertoire diversity of peripheral PD-1⁺CD8⁺ T cells predicts clinical outcomes after immunotherapy in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol. Res.* **2020**, *8*, 146–154. [[CrossRef](#)]
41. Singal, G.; Miller, P.G.; Agarwala, V.; Li, G.; Kaushik, G.; Backenroth, D.; Gossai, A.; Frampton, G.M.; Torres, A.Z.; Lehnert, E.M.; et al. Association of Patient Characteristics and Tumor Genomics With Clinical Outcomes Among Patients With Non-Small Cell Lung Cancer Using a Clinicogenomic Database. *JAMA* **2019**, *321*, 1391–1399. [[CrossRef](#)]
42. Hernandez, C.P.; Morrow, K.; Velasco, C.; Wyczechowska, D.D.; Naura, A.S.; Rodriguez, P.C. Effects of cigarette smoke extract on primary activated T cells. *Cell. Immunol.* **2013**, *282*, 38–43. [[CrossRef](#)]
43. Cha, E.; Klinger, M.; Hou, Y.; Cummings, C.; Ribas, A.; Faham, M.; Fong, L. Improved survival with T cell clonotype stability after anti-CTLA-4 treatment in cancer patients. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 238ra70. [[CrossRef](#)]
44. Liu, Y.; Yang, Q.; Yang, J.; Cao, R.; Liang, J.; Liu, Y.-T.; Zeng, Y.-L.; Chen, S.; Xia, X.; Zhang, K.; et al. Characteristics and prognostic significance of profiling the peripheral blood T-cell receptor repertoire in patients with advanced lung cancer. *Int. J. Cancer* **2019**, *145*, 1423–1431. [[CrossRef](#)]
45. Chen, D.S.; Mellman, I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* **2017**, *541*, 321–330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Yost, K.E.; Chang, H.Y.; Satpathy, A.T. Recruiting T cells in cancer immunotherapy. *Science* **2021**, *372*, 130–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Liu, S.; Pan, W.; Cheng, Z.; Sun, G.; Zhu, P.; Chan, F.; Hu, Y.; Zhang, X.; Dai, Y. Characterization of the T-cell receptor repertoire by deep T cell receptor sequencing in tissues from patients with prostate cancer. *Oncol. Lett.* **2018**, *15*, 1744–1752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Li, B.; Li, T.; Pignon, J.C.; Wang, B.; Wang, J.; Shukla, S.A.; Dou, R.; Chen, Q.; Hodi, F.S.; Choueiri, T.K.; et al. Landscape of tumor-infiltrating T cell repertoire of human cancers. *Nat. Genet.* **2016**, *48*, 725–732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]