

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Máster Universitario Biotecnología Clínica



FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA
SaludMadrid Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda

Estudio de la carga mutacional tumoral en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico como potencial biomarcador pronóstico de inmunoterapia adyuvante

Autor: Natalia Merten San José

Tutor: Alberto Cruz Bermúdez

Villaviciosa de Odón, 17.07.2025

1. Introducción	4-14
1.1 Cáncer de pulmón	4-7
1.1.1 Cáncer de pulmón no microcítico	5-6
1.1.2 Tratamientos	7
1.2 Inmunoterapia	7-12
1.2.1 Puntos de control en cáncer de pulmón no microcítico	8-9
1.2.2 Ensayos clínicos en proceso	9-10
1.2.3 Biomarcadores predictivos en el cáncer de pulmón	10-12
1.3 NADIM ADJUVANT	13-14
 2. Objetivos	14
 3. Metodología	15-18
3.1 Diseño de estudio y pacientes	15
3.2 Extracción de ADN de muestras de tejido parafinado y cuantificación	15
3.4 Preparación de las librerías	15-17
3.5 Análisis de calidad - Bioanalyzer	17
3.6 Cuantificación de las librerías	17
3.7 Secuenciación	17
3.8 Análisis - Ion Reporter	17
3.9 Análisis estadístico	18
 4. Resultados	19-26
4.1 Flujo de muestras	19
4.2 Resultados qPCR	19
4.3 Análisis del perfil mutacional	19-23
4.3.1 Oncoprint	19-22
4.3.2 Estudio de las mutaciones KRAS, Tp53 y MET con supervivencia	22-23
4.4.4 Análisis de la carga mutacional tumoral (TMB)	23-25
4.4.1 TMB vs DFS y OS	24
4.4.2 Estratificación por PD-L1	24-25
4.5 Análisis del TMB vs datos clínicos	25-26
4.5.1. Sexo	25
4.5.2 Estadio patológico	25
4.5.3 Expresión de PD-L1	25-26
 5. Discusión	26-30
 6. Conclusiones	30
 7. Bibliografía	31-38
	39-53
 8. Anexos	

Resumen

Este Trabajo de Fin de Máster analiza el perfil mutacional y la carga mutacional tumoral (TMB) en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) en estadio IIA-IIIA tratados con quimio-inmunoterapia adyuvante dentro del ensayo clínico NADIM ADJUVANT. Se incluyeron 32 muestras tumorales de la rama experimental, secuenciadas mediante tecnología NGS con un panel de 1,7 mega bases y 409 genes relacionados con el cáncer. El objetivo fue identificar mutaciones relevantes y evaluar su posible valor pronóstico, así como la asociación entre TMB, supervivencia libre de enfermedad (DFS) y supervivencia global (OS).

Los genes KRAS, Tp53 y MET fueron los más comúnmente mutados. Sin embargo, no se observó una asociación estadísticamente significativa entre estas mutaciones y la supervivencia. Del mismo modo, la comparación entre TMB alto y bajo no mostró diferencias significativas en DFS u OS. A pesar de esto, un hallazgo clínicamente relevante fue la detección de una mutación no identificada previamente en el gen EGFR, pese a ser criterio de exclusión del ensayo. Esto resalta la capacidad de NGS para revelar alteraciones genéticas no detectadas por técnicas clínicas convencionales, con implicaciones directas.

Summary

This Master's Thesis analyses the mutational profile and tumour mutational burden (TMB) in patients with stage IIA-IIA non-small cell lung cancer (NSCLC) treated with adjuvant chemo-immunotherapy within the NADIM ADJUVANT clinical trial. A total of 32 tumour samples from the experimental arm were analysed using next-generation sequencing (NGS) with a 1.7 mega base panel covering 409 cancer-related genes. The objective was to identify clinically relevant mutations and assess their prognostic value, as well as the association between TMB, disease-free survival (DFS), and overall survival (OS).

The most frequently mutated genes were KRAS, Tp53 and MET. However, no statistically significant association was found between these mutations or TMB levels and survival outcomes. Despite this, a clinically relevant finding was the detection of an EGFR mutation not previously identified, despite being an exclusion criterion for the trial. This highlights the value of NGS in uncovering mutations missed by standard clinical techniques.

1. Introducción

1.1. Cáncer de pulmón

La Organización Mundial de la salud define el cáncer como un "conjunto de enfermedades que se pueden originar en casi cualquier órgano o tejido del cuerpo cuando células anormales crecen de forma descontrolada, sobrepasan sus límites habituales e invaden partes adyacentes del cuerpo y/o propagan a otros órganos" (World Health Organization, s. f.). El número de cánceres diagnosticados en España en 2024 fue de 286.664 casos según los cálculos de REDECAN, y se espera que este número se vea incrementado en los próximos años (Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), s. f.). Este incremento de la incidencia, también estimado mundialmente, refleja uno de los principales problemas de la salud pública.

El cáncer de pulmón se ha convertido en el tipo de cáncer más diagnosticado tanto en hombres como en mujeres, superando al cáncer de mama, que había predominado en décadas anteriores. En el año 2022, se registraron aproximadamente 2.5 millones de casos de cáncer de pulmón, lo que equivale al 12.4% del total de diagnósticos oncológicos (Fig. 1) (Bray et al., 2024). Además de su alta incidencia, este tipo de cáncer se consolida como la principal causa de mortalidad por cáncer a nivel mundial, al concentrar el 18.7% de las muertes por esta enfermedad en ambos sexos (International Agency for Research on Cancer (IARC), s. f.).

Las células del cáncer de pulmón presentan alteraciones en los circuitos reguladores que controlan la proliferación celular normal y la homeostasis. Se considera que, mediante un

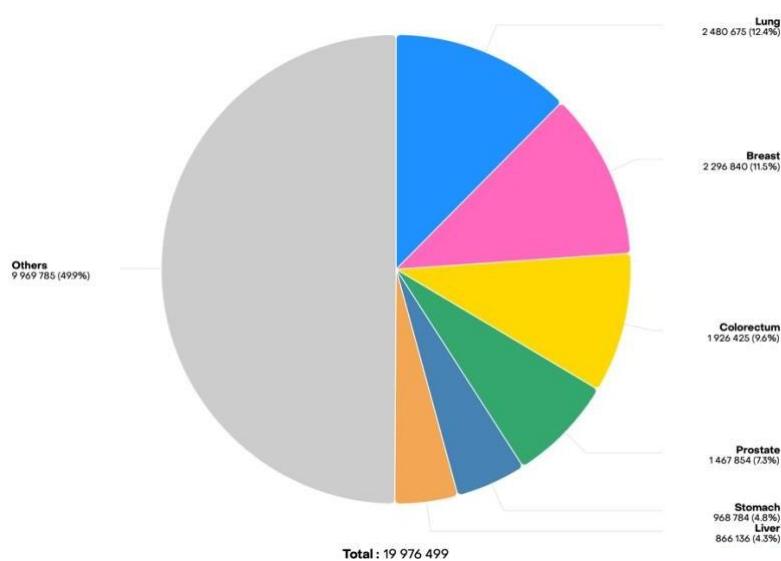


Figura 1: Incidencia mundial de los tipos de cánceres en ambos sexos en 2022 (International Agency for Research on Cancer (IARC), s. f.)

proceso de múltiples etapas, a través de una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas, un fenotipo pulmonar normal puede desembocar en un cáncer invasivo (Nowell, 1976). Tras el desarrollo del tumor primario, la acumulación progresiva de dichas anomalías, adquiridas durante la expansión clonal,

influye en los procesos de metástasis y resistencia a la terapia oncológica (Association internationale pour l'étude du cancer du poumon, 2010; Lemjabbar-Alaoui et al., 2015).

1.1.1. Cáncer de pulmón no microcítico

El cáncer de pulmón comienza cuando las células crecen de manera anormal y sin control en los pulmones, y sus principales síntomas incluyen tos persistente, dolor torácico y disnea (Organización Mundial de la Salud, s. f.). En su categorización histológica, el cáncer pulmonar no microcítico (CPNM) representa el 85% de todos los casos, siendo el cáncer de pulmón de células pequeñas menos común pero más agresivo, debido a su rápido crecimiento (Provencio et al., 2024). El cáncer de pulmón no microcítico se subdivide a su vez según las células afectadas, siendo los grupos más relevantes los adenocarcinomas, originado en células glandulares productoras del moco; el carcinoma escamoso, que se desarrolla a partir de las células que recubren las vías respiratorias; y el carcinoma de células grandes (Siddique et al., 2024).

Un sistema de clasificación estandarizado es crucial durante el desarrollo y crecimiento de estos cánceres, especialmente para su preciso diagnóstico y tratamiento. El actual sistema propuesto por la International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), está basado en la estadificación de la enfermedad y abarca los siguientes tres parámetros:

Sistema TNM

- T (Tumor Primario)

Evalúa el tamaño del tumor y su grado de invasión a estructuras adyacentes, ya sean centrales o periféricas. Según estos criterios, el tumor se clasifica en cinco categorías, de T0 a T4.

- N (Afectación de ganglios linfáticos regionales)

Indica la localización y el grado de afectación de los ganglios linfáticos por parte del tumor.

Esta categoría se divide en cuatro niveles de N0 a N3.

- M (Metástasis a distancia)

Informa sobre la presencia de diseminación tumoral más allá de la localización primaria. Se clasifica en: M1a, cuando existen nódulos tumorales adicionales en las estructuras pleurales o pericárdicas; M1b, cuando hay una única metástasis extratorácica; y M1c, en caso de múltiples metástasis en uno o varios órganos.

Según la valoración de estos parámetros, se puede establecer el estadio del cáncer de pulmón que presenta el paciente. La tabla 3 del anexo muestra la octava edición de la guía para dicha estadificación.

La figura 2 muestra las diferencias entre los estadios del cáncer de pulmón no microcítico, así como sus características en cuanto al tamaño del tumor, las localizaciones de afectación linfática y los posibles tejidos invadidos por metástasis distante.

Una de las principales causas de la baja tasa de supervivencia del cáncer de pulmón de célula no pequeña continúa siendo el diagnóstico en fases avanzadas de la enfermedad. Aunque se han producido avances tecnológicos en las pruebas de detección, como la tomografía computarizada, solo un 20% de los pacientes son diagnosticados en estadios tempranos (I y II), mientras que aproximadamente un 50% en estadio IV, presentando metástasis distante y mayor dificultad de tratamiento (Provencio et al., 2022). La figura 3 muestra los porcentajes de casos diagnóstico y los porcentajes de supervivencia según el estadio del cáncer respectivamente. Estos datos evidencian la necesidad urgente de desarrollar métodos de diagnóstico más sensibles y tratamientos más eficaces que permitan una detección precoz y una intervención terapéutica oportuna. Entre las estrategias más prometedoras se encuentran los biomarcadores, impulsados por el avance en el conocimiento de la biología del cáncer, que facilitarán la selección de tratamientos más eficaces y seguros, adaptados a las características individuales de cada paciente y contribuyendo a una mayor personalización de la atención oncológica.

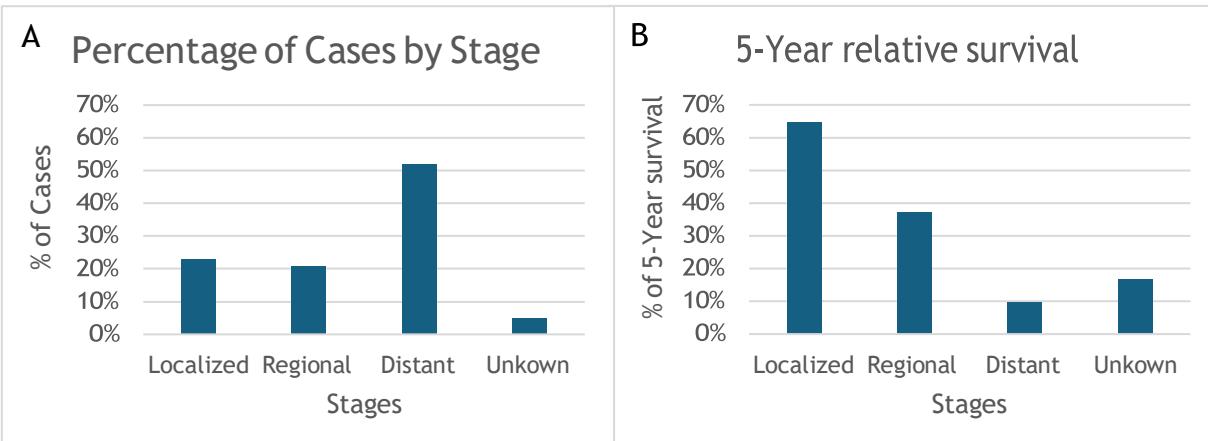
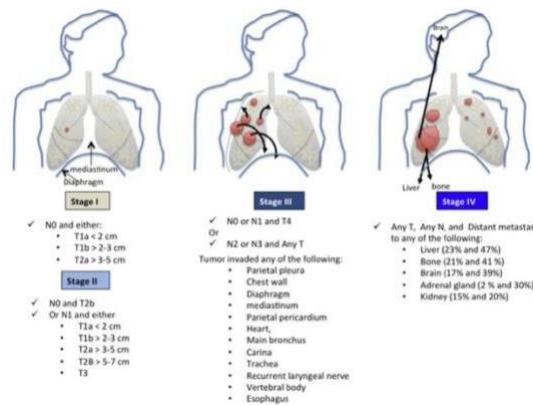


Figura 3: Gráficos sobre la tasa de (A) incidencia y (B) supervivencia a 5 años después del diagnóstico en cáncer de pulmón según el estadio (National Cancer Institute, 2025).

1.1.2. Tratamientos

Las opciones de tratamiento para el cáncer de pulmón no microcítico se basan principalmente en el estadio de la enfermedad, aunque también deben considerarse factores como la salud general del paciente y la función pulmonar para la decisión de un tratamiento oportuno y adaptado. En los estadios tempranos (0, I, II), la cirugía es el tratamiento principal, siendo la segmentectomía o la lobectomía las técnicas mayormente utilizadas; en casos extremos, puede requerirse una neumonectomía. Cuando existe riesgo de recaída se añade quimioterapia o inmunoterapia, debido a su demostrada eficacia y mejor resultado de supervivencia (American Cancer Society, 2025; García-Campelo et al., 2015). En la enfermedad localmente avanzada (estadio III), la combinación de quimioterapia y radioterapia es la estrategia más empleada. Si las condiciones y el estado físico del paciente lo permiten, puede considerarse cirugía tras un tratamiento neoadyuvante. Posteriormente, se emplea inmunoterapia como tratamiento de consolidación para mantener los resultados obtenidos y evitar la progresión del cáncer. Finalmente, en los estadios metastásicos (estadio IV), cuando la enfermedad ha alcanzado órganos distantes y la cirugía no ofrece beneficio curativo, lo que se traduce en un mal pronóstico y una baja tasa de supervivencia (Fig. 3), el tratamiento se basa en un enfoque sistémico personalizado. Este puede incluir quimioterapia, inmunoterapia, terapias dirigidas y radioterapia paliativa, con el objetivo de prolongar la supervivencia y mejorar la calidad de vida (American Cancer Society, 2025).

1.2. Inmunoterapia

La inmunoterapia representa un cambio de paradigma en el tratamiento oncológico. El objetivo de este tipo de terapia es superar la inmunosupresión inducida por el tumor y su microambiente, permitiendo de esta manera que el sistema inmunológico se reactive y promueva la respuesta contra las células cancerosas. La era de la inmunoterapia comenzó cuando el primer inhibidor del punto de control inmunitario CTLA-4, Ipilimumab, fue aprobado en 2015 (Billan et al., 2020). Desde entonces, múltiples estudios clínicos han demostrado beneficios clínicos relevantes en pacientes tratados con este prometedor enfoque, lo que ha llevado a la aprobación de diversas inmunoterapias para el tratamiento de cánceres, enfermedades autoinmunes y enfermedades infecciosas.

1.2.1 Puntos de control en cáncer de pulmón no microcítico

Anteriormente, las terapias del cáncer de pulmón se limitaban a la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia. Sin embargo, debido a los avanzados estadios en el momento de diagnóstico, estas estrategias solo ofrecían un alivio de los síntomas y una leve mejora de la supervivencia, pero no resultaban en curación completa (Cancer Research Institute, s. f.). En las últimas décadas, avances en el conocimiento sobre el mecanismo inmunitario y las fases de activación y desactivación de los linfocitos han proporcionado dianas para interferir en la evasión inmunitaria tumoral (Q. Huang et al., 2022). Una característica esencial del sistema immunológico es su capacidad para distinguir entre células propias y ajena, evitando así atacar tejidos normales. Este mecanismo de autorregulación se logra mediante proteínas denominadas puntos de control inmunitarios, que regulan la activación de las células inmunes. Sin embargo, algunas células tumorales pueden explotar estos mecanismos para evadir la detección y destrucción por parte del sistema inmunológico. Dos importantes dianas en el contexto del cáncer de pulmón no microcítico es el receptor CTLA-4 y la unión PD-1/PD-L1. Por un lado, la unión de CTLA-4 a los ligandos CD80 y CD86 de las células presentadoras de antígenos, envía una fuerte señal inhibidora a los linfocitos T CD4. Por otro lado, la proteína de muerte celular programada (PD-1) que se expresa en células T activadas y su ligando (PD-L1) son responsables de la regulación negativa y en caso de interacción inhibe la función efectora o incluso promueve apoptosis (Instituto Nacional del Cáncer, 2020). Una variedad de anticuerpos

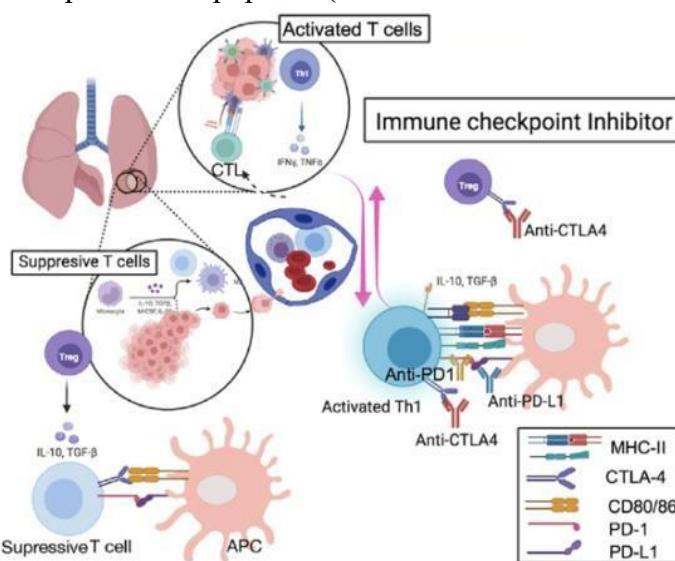


Figura 4: Mecanismo de la inhibición de los puntos de control en tumores. A: Microambiente tumoral promueve citoquinas que promueven la inducción de la tolerancia inmunitaria y el reclutamiento de células T reguladoras. Células presentadoras de antígenos y células T supresoras permiten el crecimiento e invasión tumoral. B: anticuerpo monoclonal humanizado bloquea la unión del receptor con el ligando de los puntos de control reactivando la función efectora de las células T

monoclonales dirigidos a bloquear las uniones de CTLA-4 y PD-L1 han resultado satisfactorios y eficaces, por lo que la inmunoterapia ha supuesto una auténtica revolución en el ámbito de la oncología (Q. Huang et al., 2022).

La FDA aprobó como primer inhibidor de puntos de control y primer tratamiento en el campo de la inmunoterapia

Ipilimumab (Yervoy), un bloqueador de la unión de CTLA-4 a sus ligandos diseñado por Jill Allison, ganador de un premio nobel por su investigación y descubrimiento de la inmunoterapia. Tremelimumab (Imjudo) es otro medicamento que se une a la proteína CTLA-4 y se prescribe para diferentes tipos de cáncer, entre otros el cáncer de pulmón no microcítico. El nivolumab (Opdivo), el pembrolizumab (Keytruda) y el cemiplimab (Libtayo) son medicamentos diseñados para inhibir la unión de PD-1/PD-L1 y frenar de esta manera la desactivación de las células T y reforzar la respuesta inmunitaria contra las células cancerosas. En concreto se dirigen a la PD-1 en las células del sistema inmunitario, mientras que atezolizumab (Tecentriq) y durvalumab (Imfinzi) están dirigidas a PD-L1, el ligando que se encuentra en las células tumorales, pero comparten el objetivo disminuir el tamaño del tumor y desacelerar su crecimiento (American Cancer Society, 25d. C.).

1.2.2 Ensayos clínicos en proceso

Desde la aparición de las terapias basadas en inhibidores de puntos de control inmunitario (ICI por sus siglas en inglés), el desarrollo de ensayos clínicos en el contexto del cáncer de pulmón no microcítico ha experimentado un auge continuo. El ensayo PACIFIC, que demostró unas mejoras significativas en la supervivencia libre de progresión de durvalumab para pacientes con cáncer de pulmón no microcítico de estado III, exemplificó el impacto de la inmunoterapia y sirvió como un referente clave en el tratamiento de esta enfermedad.

Inmunoterapia neoadyuvante

El tratamiento neoadyuvante, administrado antes de la cirugía, es objeto de investigación en varios estudios. El ensayo Checkmate-816 compara la combinación de nivolumab y quimioterapia basada en platino con quimioterapia en pacientes con CPNM en estadio IB-IIIA. Los resultados han demostrado beneficio en la respuesta patológica completa (RPc) y la supervivencia libre de eventos (DFS por sus siglas en inglés) con la terapia combinada (Forde et al., 2025).

Inmunoterapia Perioperatoria

El enfoque perioperatorio, que implica la administración de inmunoterapia tanto antes como después de la cirugía, se evalúa en ensayos como AEGEAN (durvalumab), KEYNOTE 671 (pembrolizumab), CheckMate-77T (nivolumab), Neotorch (toripalimab) y Rationale-315 (tislelizumab). Estos estudios muestran resultados prometedores, con mejoras en la RPc y SLE observadas con la adición de inmunoterapia a la quimioterapia estándar.

Inmunoterapia adyuvante

La inmunoterapia adyuvante, administrada después de la cirugía, también muestra ser beneficiosa en ciertos casos. Los ensayos Impower-010 y KEYNOTE-091 (PEARLS) evalúan el uso de atezolizumab y pembrolizumab, respectivamente, en pacientes que se someten a resección completa del tumor. Estos estudios demuestran mejoras en la supervivencia libre de enfermedad con el tratamiento adyuvante, lo que sugiere que puede ayudar a reducir el riesgo de recurrencia.

Inmunoterapia en el contexto no quirúrgico

Para los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico en estadio III no resecable, el prometedor avance de la inmunoterapia está cambiando el estándar de tratamiento ofreciendo nuevas esperanzas en su abordaje terapéutico. El ensayo Gemstone-301 evalúa el uso de sugemalimab (dirigido contra PD-L1) en este contexto, con resultados también positivos en términos de SLP.

Los resultados de estos ensayos clínicos de fase III de cáncer de pulmón de célula no pequeña sostienen el creciente uso en la inmunoterapia que supone un cambio trascendental y un avance prometedor en el ámbito de la oncología. Sin embargo, la tasa de respuesta es muy variable entre los pacientes y con baja opción de previsión. Debido al costo y la toxicidad de estas novedosas terapias, un desafío crítico en este campo es la identificación de biomarcadores predictivos para discriminar qué pacientes pueden responder a la inmunoterapia. Estos biomarcadores proporcionan el camino hacia la medicina personalizada, llegando a enlazar al paciente específico con el tratamiento óptimo (Q. Huang et al., 2022; Phillips et al., 2025; Rossi et al., 2023).

1.2.3 Biomarcadores predictivos en el cáncer de pulmón

Según el Instituto Nacional del Cáncer, un biomarcador es una molécula biológica que se encuentra en la sangre, otros líquidos o tejidos del cuerpo, y cuya presencia es un signo de un proceso normal o anormal, de una afección o de una enfermedad. En el contexto del cáncer, estos marcadores pueden ofrecer información sobre el grado de malignidad del tumor y la posible respuesta al tratamiento (AEACAP - Asociación Española de Afectados de Cáncer de Pulmón, 2025). Los biomarcadores para la elección de los tratamientos frente al cáncer de pulmón no microcítico y la predicción de su respuesta incluyen el nivel de expresión de PD-

L1, la caracterización y cuantificación de células inmunológicas, la presencia de neoantígenos, y otros indicadores relacionados con el sistema inmunitario (Billan et al., 2020).

El eje PD-1/PD-L1 ha emergido como una diana clave en inmunoterapia oncológica, mostrando respuestas clínicas significativas en varios tipos de cáncer. La sobreexpresión de PD-L1 detectada por inmunohistoquímica en pacientes con cáncer de pulmón se asocia con mejores resultados terapéuticos, lo que resalta su potencial como biomarcador predictivo de esta novedosa terapia. No obstante, se han observado respuestas clínicas significativas también en algunos pacientes con baja expresión de PD-L1, lo cual dificulta el uso de este biomarcador como único criterio de selección (Patel & Kurzrock, 2015). Además, como el tejido tumoral no permite la monitorización durante el tratamiento con biopsias continuas, se necesitan nuevos biomarcadores de la respuesta a los ICI para determinar la eficacia del tratamiento clínico.

En este sentido, el desarrollo de tecnologías como *next generation sequencing* (NGS) ha revolucionado la caracterización de la caracterización del sistema inmunitario, permitiendo entre otras, el análisis del repertorio de TCR. Se ha demostrado que una alta diversidad de dicho repertorio en la sangre periférica se asocia con una respuesta inmune mejorada en incluso diferentes tipos de tumores, lo cual sugiere su utilidad como biomarcador predictivo (A.-L. Huang et al., 2024).

Adicionalmente a estas opciones, en la última década y gracias a los avances científicos, se han descubierto ciertas alteraciones genéticas responsables del desarrollo del cáncer de pulmón que sirven como factores predictivos de eficacia al tratamiento dirigido (AEACAP - Asociación Española de Afectados de Cáncer de Pulmón, 2025). Esto justifica el especial interés que tiene el estudio y la identificación de genes mutados que facilitan tanto la clasificación del cáncer, su estadio, el pronóstico y sobre todo la elección del tratamiento óptimo para cada paciente. La investigación oncológica ha demostrado que un aumento de proteínas tumorales anormales y, por lo tanto, neoantígenos, se asocia con una mayor respuesta inmunológica. Esto se debe a que los glóbulos blancos especializados del sistema inmunológico son capaces de reconocer proteínas nuevas y anormales como extrañas, para consecuentemente atacarlas y activar el resto de las señalizaciones de la respuesta inmune. Las células tumorales que carecen de expresión de neoantígenos pueden no ser reconocidas ni eliminadas por las células T del sistema inmunitario del paciente. El TMB, la carga mutacional tumoral (definido como número de mutaciones por megabase secuenciada), sirve como medida indirecta de dichos neoantígenos y de los cambios genéticos de las células tumorales en una cantidad específica de ADN. En consecuencia, la carga mutacional es tanto un biomarcador pronóstico como predictivo; debido

a la información que proporciona acerca de la enfermedad y su curso, y dado que revela la posible respuesta a un tratamiento en particular. Este biomarcador es sobre todo útil en cánceres tumorales sólidos, incluyendo el cáncer colorrectal, el melanoma y el cáncer de pulmón de células no pequeñas. Ciertas técnicas basadas en la secuenciación permiten que el TMB se estime de manera confiable con muestras de biopsia del tumor a partir de un subconjunto del exoma, sin necesidad de secuenciar el exoma completo. Hay estudios paralelos que están evaluando la carga mutacional tumoral a través del ADN tumoral circulante (ctDNA) en sangre, una técnica aún en fase de investigación, pero con potencial uso clínico futuro (Know Your Biomarker, 2022; Nowell, 1976).

Además del TMB, se recomienda analizar las alteraciones EGFR, ALK, ROS-1 y BRAF en células tumorales de pacientes de cáncer de pulmón no microcítico, debido a que está indicado en guías clínicas de la ESMO, sobre todo para pacientes metastásicos. Estos genes codifican para diferentes proteínas que participan en la señalización y división celular. Mutaciones resultan en proteínas anormales que desencadenan señalizaciones constantes y promueven la proliferación desinhibida de las células tumorales, así como la resistencia a la muerte celular programada, invasión de las células adyacentes e incluso la metástasis. Otras mutaciones como en genes como BRAF, HER2, MET, NRG1, NTRK, RET constituyen nuevas y potenciales dianas terapéuticas en cáncer no microcítico y están en constante estudio para futuros fármacos dirigidos y como biomarcadores predictivos (AEACAP - Asociación Española de Afectados de Cáncer de Pulmón, 2025).

La figura 5 muestra la carga mutacional en distintos tipos de cáncer, destacando que tanto el adenocarcinoma de pulmón (Lung-AdenoCa), un subtipo de CPNM; como el de células pequeñas presentan valores elevados en comparación con otros tumores sólidos. Esta alta TMB apoya el interés creciente en el estudio de las mutaciones en cáncer de pulmón, y respalda su potencial como biomarcador predictivo de respuesta a la inmunoterapia.

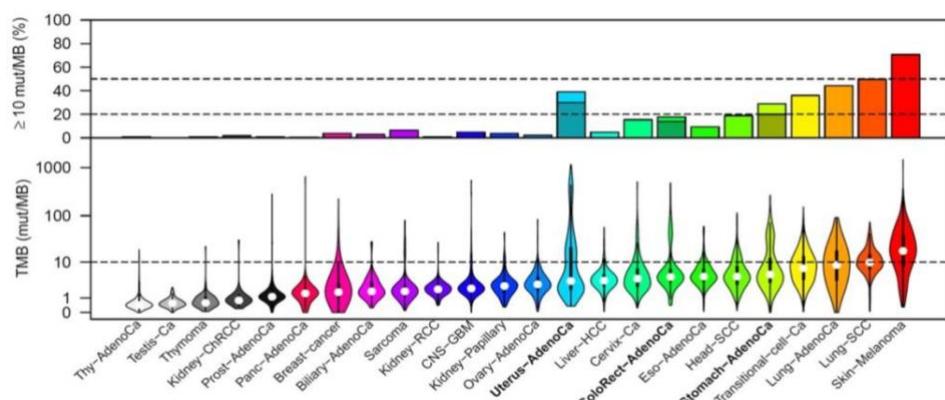


Figura 5: Niveles medios de TMB individual (mutaciones por megabase) y porcentaje de muestras con TMB $\geq 10\text{mut}/\text{Mb}$ en distintos tipos de cáncer

1.3 NADIM ADJUVANT

Para este estudio, se utilizan muestras de pacientes del ensayo clínico en curso NADIM ADJUVANT (NCT04564157), cuyo objetivo principal es evaluar la supervivencia libre de enfermedad (DFS) en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico de estadio IB-IIIA completamente resecados (Calvo et al., 2021). Se trata de un ensayo clínico abierto, aleatorio, de dos brazos y multicéntrico, que observa la eficacia de la propuesta combinación de immunoterapia con quimioterapia como tratamiento adyuvante tras la cirugía frente a quimioterapia. El tamaño total de la muestra es de 210, asignando 105 pacientes a cada brazo. Los pacientes aleatorizados al grupo experimental reciben el anticuerpo monoclonal Nivolumab 260mg como inmunoterapia en combinación con Paclitaxel 200mg/m² y carboplatino AUC5 durante 4 ciclos cada 21 días. Además de este tratamiento adyuvante, se les administra Nivolumab 480 mg Q4N durante 6 ciclos como tratamiento de mantenimiento. Por otro lado, los 105 pacientes asignados al grupo control reciben Paclitaxel 200 mg/m² más carboplatino AUC5 de igual modo durante 4 ciclos cada 21 días careciendo de inmunoterapia. Este estudio de fase 3 es de tipo intervencionista y asignación paralela. Su fecha de inicio fue el 13/01/2021 con una fecha de finalización primaria estimada del 01/04/2030 y del estudio completo un año más tarde (ClinicalTrials.gov, s. f.).

Para una correcta y concreta selección de los pacientes se establecieron unos criterios de inclusión y exclusión determinados. Por un lado, los pacientes deben clasificarse postoperatoriamente en la etapa IB (= 4cm), II o IIIA de acuerdo con los criterios del sistema propuesto por la IASLC (Tabla 1). Además, la intervención quirúrgica del CPNM primario también es requisito para la participación en el ensayo, así como la resección completa confirmada. Como en la mayoría de los ensayos clínicos, se exige una mínima edad de 18 años, así como el consentimiento del paciente de manera adecuada según lo establecido. En cuanto a los criterios de exclusión, destacan los antecedentes de otras enfermedades malignas, así como diferentes mutaciones genéticas incluyendo ALK o EGFR. Además, se excluyen para el ensayo pacientes con inmunodeficiencia y de forma estricta, mujeres embarazadas o en periodo de lactancia. Dado que las intervenciones quirúrgicas aceptadas son lobectomía, resección de la manga, bilobectomía o neumonectomía, los pacientes en los que se haya llevado a cabo una segmentectomía o una resección de cuña no son considerados elegibles para participar en el ensayo clínico (American Cancer Society, 2025; National Cancer Institute, 2025).

Los resultados del ensayo clínico NADIM ADJUVANT constituyen una evidencia preliminar que respalda la hipótesis sobre la eficacia de la combinación de inmunoterapia y quimioterapia (CT-IO) en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico en estadios IB-IIIA candidatos a tratamiento adyuvante, y refuerzan el potencial de esta estrategia como una opción prometedora en fases tempranas de enfermedad, con expectativas de integrarse en el estándar clínico en un futuro próximo (Calvo et al., 2021).

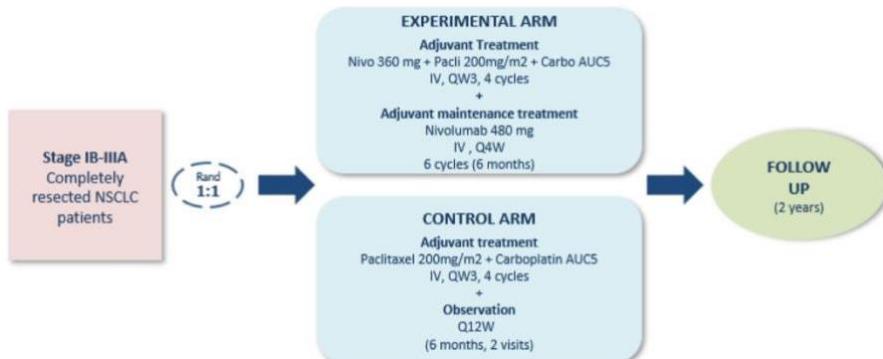


Figura 6: Esquema del tratamiento del ensayo NADIM ADJUVANT

2. Objetivos

Objetivo principal

Estudio del perfil mutacional basal en pacientes de cáncer de pulmón no microcítico tratados con Quimio-inmunoterapia adyuvante (después de la cirugía) incluidos en el ensayo NADIM adjuvant (NCT04564157) como posible fuente de biomarcadores de supervivencia en este nuevo escenario terapéutico.

Objetivos secundarios

Describir el perfil mutacional de los tumores de los pacientes mediante técnicas de secuenciación de nueva generación a partir de la pieza quirúrgica de resección tumoral.

Estudiar la correlación entre la carga mutacional tumoral y la presencia de mutaciones específicas con la recaída del cáncer de pulmón no microcítico tras cirugía e inmunoterapia adyuvante por medio de los parámetros de supervivencia libre de enfermedad (DFS) y la supervivencia global (OS).

3. Metodología

3.1 Diseño de estudio y pacientes

Las muestras utilizadas en este estudio traslacional eran las pertenecientes a los pacientes del ensayo clínico NADIM ADJUVANT (NCT04564157), promovido por el Grupo Español de Cáncer de Pulmón (GECP). De los 210 pacientes reclutados, 105 fueron seleccionados de la rama experimental de forma aleatorizada, tratados tanto con una combinación de quimioterapia con inmunoterapia. Para la selección de pacientes a analizar, se priorizaron los pacientes con registro de progresión de la enfermedad, para el interés del análisis sobre la correlación de las mutaciones y la progresión o recaída del paciente; así como según la concentración de DNA disponible tras la extracción, por los requisitos técnicos de la secuenciación. Adicionalmente a su pertenencia a la rama experimental y su progresión, se eligieron las muestras de tejido provenientes exclusivamente del tumor, excluyendo las provenientes de parénquima o ganglios; así como solamente aquellas con confirmación de presencia de células tumorales viables en el análisis de la hematoxilina eosina representativa.

3.2 Extracción de ADN de muestras de tejido parafinado y cuantificación

Los bloques quirúrgicos de tejido fueron enviados por los centros colaboradores del proyecto en el momento de la resección quirúrgica, previa al tratamiento en forma de bloques fijados con formalina y embebidos en parafina (FFPE en inglés). En el anexo X se incluye una tabla con los detalles y características de las muestras, relevantes para este estudio. La extracción de ADN fue realizada mediante el kit de truXTRAC FFPE DNA (Covaris), y posteriormente su cuantificación de la concentración se llevó a cabo mediante el kit QUBIT dsDNA HS Assay (Thermo Fisher). Las muestras resultantes de ADN fueron preservadas a -80°C hasta el momento de su uso, su concentración fue recuantificada el día de la preparación de las librerías mediante el mismo kit para evitar cálculos erróneos o poco específicos.

3.4 Preparación de las librerías

La preparación de las librerías es el paso previo y esencial de la secuenciación, que fue realizado a posteriori con el aparato Ion Chef (Thermo Fisher Scientific) y el secuenciador S5 System (Thermo Fisher). El secuenciador requiere una concentración mínima de 50 pM en las librerías para poder secuenciarlas. Por este motivo, no todas las muestras preseleccionadas, pudieron ser secuenciadas finalmente, modificando de esta manera ligeramente nuestra planificación y selección final de pacientes del ensayo.

La preparación de las librerías constaba de las siguientes etapas:

- Pre-tratamiento con UDG

La enzima uracilo-ADN glicosilasa (UDG) permite reparaciones en el DNA y por lo tanto evitar artefactos en la secuenciación de mutaciones. Esta encima elimina uracilos que pueden estar presentes en el ADN de manera anómala por ejemplo por desaminación espontánea de citosinas (C->U), lo cual es un daño frecuente en ADN antiguo. Por esta razón, previo a la amplificación del ADN las muestras son pretratadas con UDG, cuya actividad se regula a través de unas temperaturas específicas. El input necesario del DNA es de 20ng, por lo que se calcula según la concentración medida con el QUBIT el volumen de DNA a introducir con el resto de Low TE y 1 μ l establecido de UDG, generando un volumen total de 7,5 μ l

- Generación de amplicones

La amplificación se llevó a cabo mediante PCR en determinadas regiones de interés del DNA, en este caso las mutaciones tumorales, predeterminadas por el kit de Thermo Fisher. El ADN tratado con UDG (7.5 μ l) es mezclado con 5 μ l de 5X Ion AmpliSeq HiFi Mix, de los cuales se generaban dos reacciones diferentes con dos pools diferentes de primers con un volumen final de 10 μ l cada uno.

- Digestión parcial de los amplicones

Para la digestión se combinaban ambas amplificaciones de diferentes primers y se añadían 2 μ l de la enzima FuPa generando un volumen total de 22 μ l. Este reactivo realiza una digestión parcial de los primers y fosforila los amplicones, esencial para la ligación de los barcodes a continuación.

- Ligación de los barcodes

La ligación de los barcodes es crucial para poder distinguir las librerías tras la secuenciación y poder asignarlas a una muestra y por lo tanto a un paciente. El tipo de barcode utilizado es Ion Dual 1-96, tratando cada muestra con uno diferente. La incorporación de 4 μ l de la Switch Solution proporciona el cambio de condiciones necesario para que la ligasa (4 μ l), añadida en último lugar, actúe y enlace los adaptadores.

- Purificación de las librerías

La purificación se llevaba a cabo mediante el kit Agencourt AMPure XP, y consiste en aislar las librerías, eliminando el resto de los compuestos o impurezas para poder secuenciar a

continuación solamente el DNA de interés amplificado. Las beads magnéticas consiguen por un lado capturar selectivamente fragmentos de DNA y por otro lado estas se unen a unos imanes por fuerzas magnéticas, lo que facilita el lavado y eliminación de contaminantes.

3.5 Análisis de calidad - BioAnalyzer

Para medir la calidad de las librerías, se ha utilizado el kit Agilet High Sensitivity, en el aparato Bioanalyzer 2100. Se ha comparado la cantidad de librerías con el control positivo de muestras anteriormente secuenciadas del ensayo NADIM II y como control negativo H₂O.

3.6 Cuantificación de las librerías

Se ha realizado una qPCR de las librerías preparadas mediante el kit Ion Library TaqMan™ Quantification Kit, para cuantificar la concentración obtenida de estas y seleccionar las que tienen el mínimo (50pM) para el Ion Chef y la posterior secuenciación.

3.7 Secuenciación

El sistema Ion Torrent Ion Chef

Este sistema, empleado antes del secuenciador, automatiza el procesamiento de librerías preparadas con AmpliSeq, facilitando la generación de plantillas y la carga de chips, lo que simplifica significativamente el flujo de trabajo.

Sistema Ion GeneStudio

Para la secuenciación se utiliza el sistema Ion GeneStudio S5, que permite la secuenciación dirigida de próxima generación (NGS) escalable y de alto rendimiento.

3.8 Análisis - Ion Reporter

Con el software de Ion Reporter se lleva a cabo el proceso de análisis de datos, debido a que ayuda a garantizar la obtención de datos de alta calidad priorizando y anotando variantes. El panel utilizado cubra 1,7 megabases de 409 genes con asociaciones cancerígenas conocidas. Las lecturas son alineadas a hg19 utilizando el Torrent Suite 2.50 y los datos fueron transferidos al Ion Reporter 5.20 para la detección de variaciones. Las mutaciones germinales son filtradas mediante el Germline Filter-chain basada en bases de datos de la población. Adicionalmente, filtramos manualmente las mutaciones con menor frecuencia del 5%, menor cobertura del 60, menor cobertura alélica de 10 lecturas o un p valor mayor a 0.05.

3.9 Análisis estadístico

Para el análisis se utilizaron diferentes pruebas estadísticas, según los grupos y las variables a analizar. Kaplan-Meier y log rank fue utilizado para comparar la supervivencia a largo tiempo para ver si las curvas difieren significativamente entre TMB alto y bajo. U-Mann Whitney fue utilizado en el análisis del TMB en relación con datos clínicos categóricos, como por ejemplo el sexo, en el que se comparan dos grupos independientes. Una tercera prueba, Kruskal-Wallis, fue aplicada para comparar más de dos grupos independientes, en el caso del estadio de los pacientes (IIA, IIB y IIIA) o la expresión de PD-L1 (negativa, baja o alta) en comparación con variables continuas como la carga mutacional tumoral. Para estas gráficas se utilizó el programa R Studio.

4. Resultados

4.1 Flujo de muestras



Figura 7: Flujo de las muestras y filtrado de pacientes para este estudio

El estudio partió de un total de 210 pacientes incluidos en el ensayo clínico NADIM ADJUVANT (NTC04564157). A lo largo del trabajo, las muestras fueron seleccionadas y filtradas según los criterios clínicos, disponibilidad de material biológico y control de calidad de las muestras. Desde un inicio se consideró óptimo para este proyecto comenzar con el análisis de la rama experimental, debido al enfoque de la eficacia del tratamiento en el análisis. En la figura 7 se muestra el flujo completo desde la cohorte inicial hasta las muestras finalmente incluidas en el análisis- De las 80 muestras recibidas para la preparación de librerías, 77 superaron el control de calidad (96%). Debido a limitación temporal, solo 39 fueron procesadas para la generación de librerías de las cuales 32 (89% sobre las generadas) fueron secuenciadas satisfactoriamente. Las muestras restantes con éxito en el control de calidad se encuentran almacenadas, así como aquellas correspondientes a la rama control, y serán procesadas en fases posteriores con el objetivo de completar el análisis del proyecto global.

4.2 Resultados qPCR

La PCR en tiempo real (qPCR) se empleó como control de calidad y para la obtención de concentración de las librerías preparadas antes de la secuenciación. Se calcularon las concentraciones a partir de la media de los duplicados técnicos y siendo multiplicadas por el factor de dilución (1:500). Los valores obtenidos fueron consistentes y dentro del rango óptimo para la carga automática en el sistema Ion Chef (Anexo, Tabla suplementaria 1). A partir de estos resultados positivos, se seleccionaron aquellas librerías con mayor concentración, priorizando los pacientes progresados, para la secuenciación de 32 muestras. Todas fueron secuenciadas con éxito y óptimas para el análisis tanto del perfil mutacional como de la carga mutacional tumoral.

4.3 Análisis del perfil mutacional

4.3.1 Oncoprint

El OncoPrint (Figura 8) representa las variantes detectadas por el NGS de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico del ensayo clínico NADIM ADJUVANT seleccionados para

este trabajo. En el lateral izquierdo se observa la supervivencia libre de enfermedad (DFS) en meses, seguida de la progresión de la enfermedad (DP), diviendo en rosa a los pacientes que han recaído y en azul a aquellos pacientes que no han registrado ningún evento hasta el momento. Aquí se observa que entre nuestros pacientes, exactamente la mitad (16/32) han presentado recaída o muerte y la otra mitad permanece vivo y libre de progresión. Dentro de los progresados, las barras grises indican los meses de la recaída o muerte, que se observa muy variada entre nuestra cohorte. En el lateral derecho se representa la carga mutacional tumoral

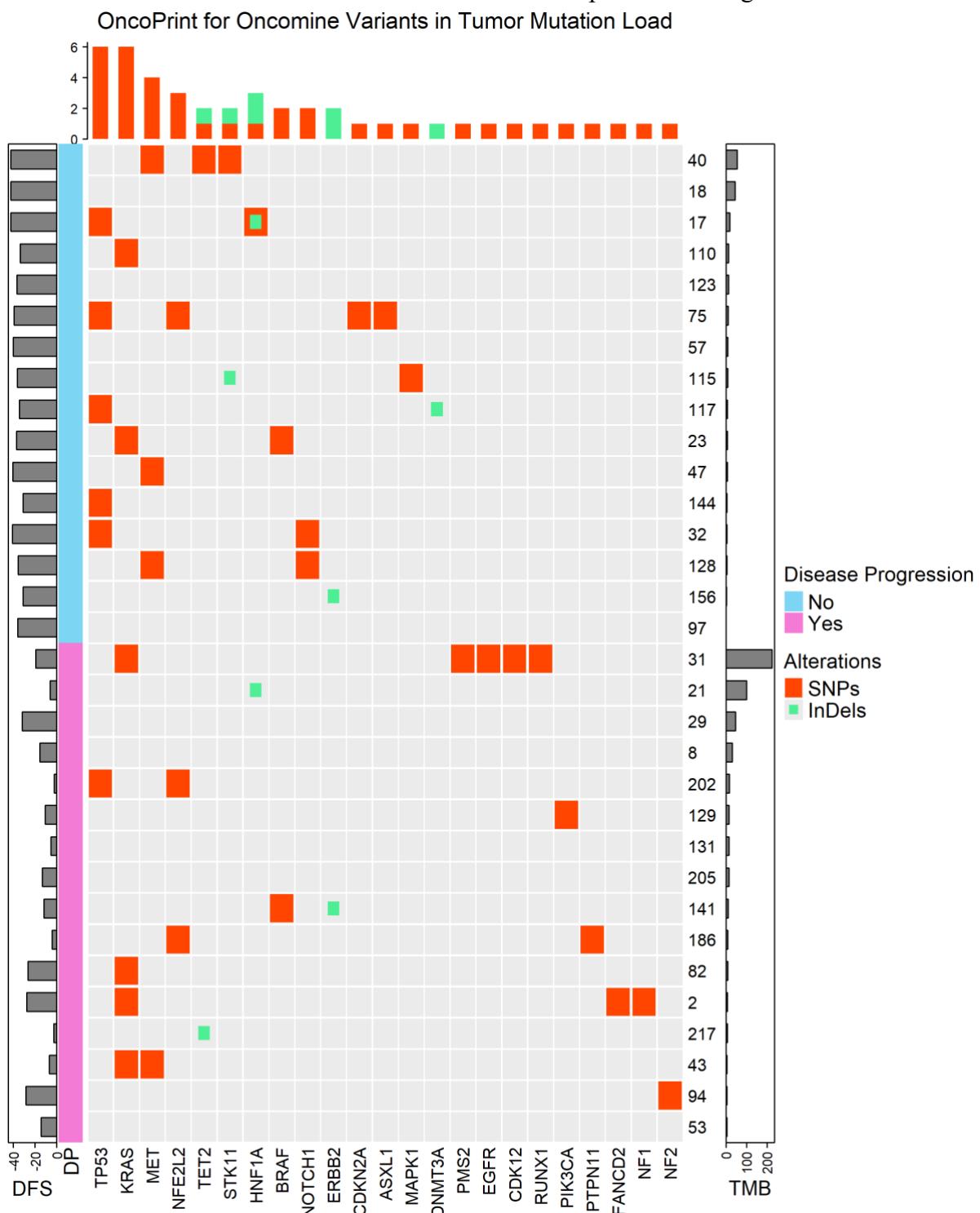


Figura 8: OncoPrint de las mutaciones y del TMB del análisis mediante NGS

de mayor a menor. Aquí también se ven diferencias, aunque la mayoría permanece en el rango entre 0 y 100, pese al paciente 31 que registra un TMB de 200. El paciente con número 31 destaca, no solo por su notable alta carga mutacional, sino también por sus numerosas alteraciones en diferentes genes. Además, este paciente presenta una mutación en el gen EGFR, discutida más adelante, e importante a mencionar es su registro de progresión al mes 19 del inicio de la terapia adyuvante. En cuanto al resto de mutaciones, resalta la prevalencia de TP53, KRAS y MET, como los genes más mutados dentro de nuestra cohorte. Tp53 y KRAS presentan mutaciones en 6 pacientes, mientras que MET en 4. La mayoría de Tp53 y MET (5/6 y 2/3 respectivamente) no han progresado y han sobrevivido libres de enfermedad hasta el momento. En el caso de KRAS son 4/6 los pacientes que han registrado algún evento, todos a diferentes meses tras comienzo del registro. Las mutaciones en los genes EGFR (1 paciente) y STK11 (2 pacientes) resultan también particularmente importantes, por su relevancia en el cáncer de pulmón no microcítico y en la respuesta a la inmunoterapia. Se trata mayormente de variaciones de un solo nucleótido, con excepción en una de las mutaciones en STK11, que presenta una delección desde el nucleótido 236 hasta el 258 (Tabla 2). Adicionalmente es interesante resaltar la presencia de BRAF, siendo este un buen marcador pronóstico a

Patient	Disease progression	Gene	Coding transcript change	Protein change	Rowtype
2	1	KRAS	c.34G>T	p.Gly12Cys	SNV
23	0	KRAS	c.34G>C	p.Gly12Arg	SNV
31	1	KRAS	c.35G>C	p.Gly12Ala	SNV
43	1	KRAS	c.183A>C	p.Gln61His	SNV
82	1	KRAS	c.35G>A	p.Gly12Asp	SNV
110	0	KRAS	c.35G>T	p.Gly12Val	SNV
17	0	TP53	c.818G>T	p.Arg273Leu	SNV
32	0	TP53	c.548C>G	p.Ser183Ter	SNV
75	0	TP53	c.701A>G	p.Tyr234Cys	SNV
117	0	TP53	c.818G>C	p.Arg273Pro	SNV
144	0	TP53	c.404G>A	p.Cys135Tyr	SNV
202	1	TP53	c.916C>T	p.Arg306Ter	SNV
40	0	MET	c.504G>T	p.Glu168Asp	SNV
43	1	MET	c.504G>T	p.Glu168Asp	SNV
47	0	MET	c.3082G>T	p.?	SNV
128	0	MET	c.2962C>T	p.Arg988Cys	SNV
31	1	EGFR	c.2281G>A	p.Asp761Asn	SNV
40	0	STK11	c.250A>T	p.Lys84Ter	SNV
115	0	STK11	c.236_258del	p.Ile79LysfsTer76	INDEL
23	0	BRAF	c.1387A>G	p.Ile463Val	SNV
141	1	BRAF	c.1742A>G	p.Asn581Ser	SNV

Tabla 3: Reporte de variaciones somáticas tras NGS en los genes KRAS, Tp53, MET, EGFR, STK11, BRAF

inmunoterapia y por su estudiada patogenicidad. Mutaciones registradas en este gen, se observan en dos pacientes, uno del grupo de progresados y el otro en supervivientes libre de enfermedad. Cabe resaltar, que diferencias entre estos pacientes son, entre otras, las co-mutaciones que presentan. El paciente libre de progresión presenta una mutación en KRAS también, mientras que el paciente que ha recaído porta dos mutaciones adicionales en Tp53 y ERBB2. En cuanto a la carga mutacional, el primero se agrupa a los de baja carga mutacional y el progresado a los de alto TMB.

4.3.2 Estudio de las mutaciones KRAS, Tp53 y MET con supervivencia

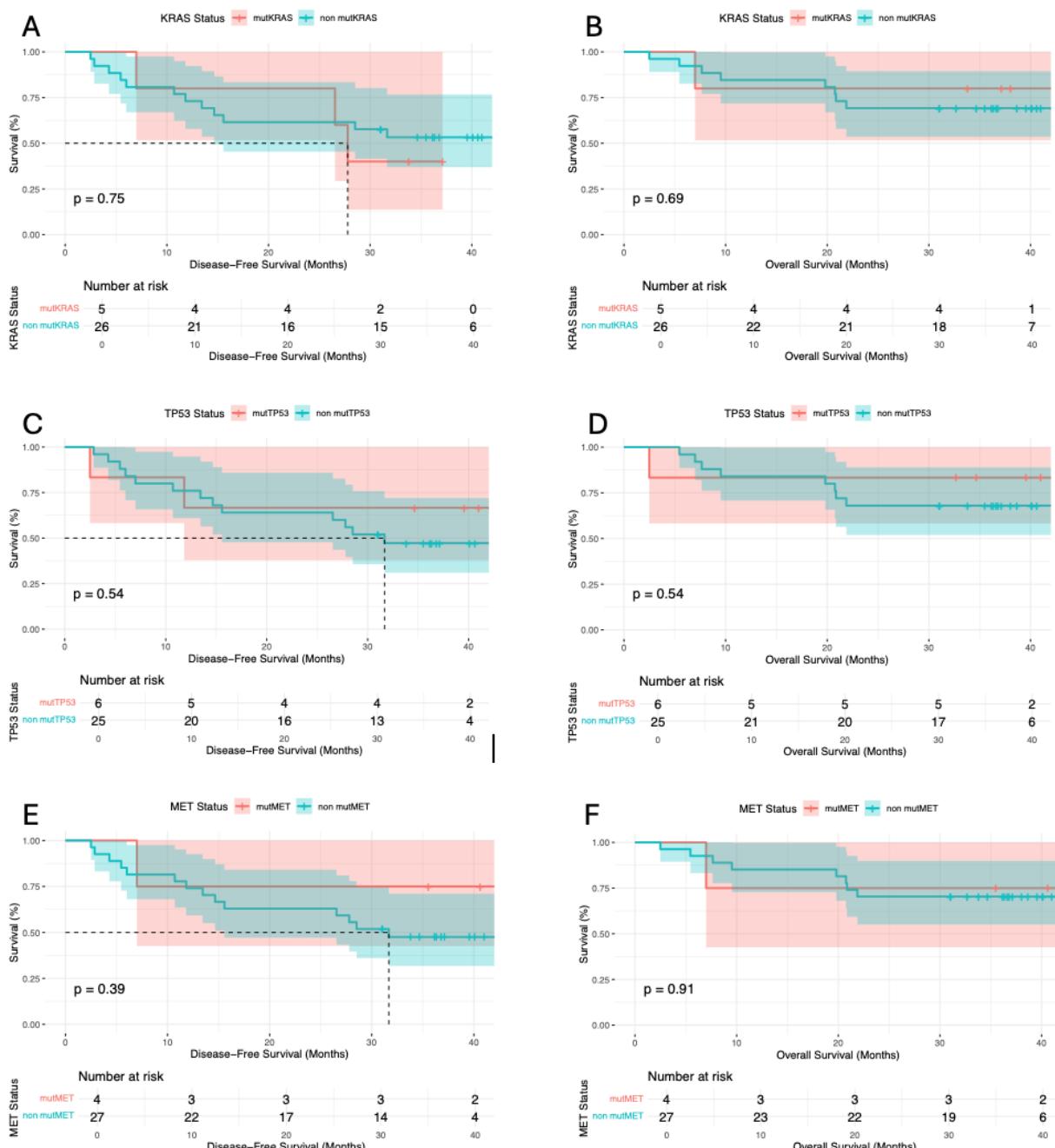


Figura 9: Mutaciones en KRAS (A,B), Tp53 (C,D) y MET (E,F) en relación con la supervivencia libre de enfermedad y a la supervivencia global

El reducido número de casos secuenciados por ahora en el proyecto limita los análisis estadísticos para determinar la asociación de mutaciones específicas con el pronóstico de los pacientes. Sin embargo, estos análisis si pueden ser realizados en mutaciones con alta prevalencia en la cohorte, como KRAS, Tp53 y MET (figura 9). De este modo, por su la alta presencia de mutaciones en el oncogen KRAS (19,35%) se estudió su relación la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global. Las mutaciones más comunes en el cáncer de pulmón no microcítico son en las moléculas constituyentes de los aminoácidos 12, 13 y 61, teniendo tanto de la primera como de la tercera en este trabajo (tabla 3). Todas las mutaciones en Tp53 detectadas en este trabajo resultan en una pérdida de función de la proteína y están descritas como patogénicas en ClinVar. Su alta prevalencia dentro de nuestra cohorte (4/31) también facilitó el estudio de asociaciones. Para las mutaciones en el gen MET, descrito como proto-oncogen y presente en 19,35% de nuestros pacientes también se realizó una Kaplan Meier también para ver la estadística.

Ninguna de las curvas muestra una asociación de las mutaciones con supervivencia tanto libre de enfermedad como global estadísticamente significativa, presentando p-valores entre 0,39 y 0,91. Cabe a destacar que todavía hay muchos casos censurados (pérdidas de seguimiento) y que estos estadios tempranos y operados, y aun más tratados con inmunoterapia pueden tener largas supervivencias >5 años. Por lo que estos datos actualizados podrían reflejar diferencias en el futuro.

4.4 Análisis de la carga mutacional tumoral (TMB)

Como objetivo secundario del trabajo, se trataba de estudiar la correlación entre la carga mutacional tumoral y la recaída del cáncer de pulmón no microcítico tras el inicio del tratamiento con quimio-inmunoterapia por medio de los parámetros de supervivencia libre de

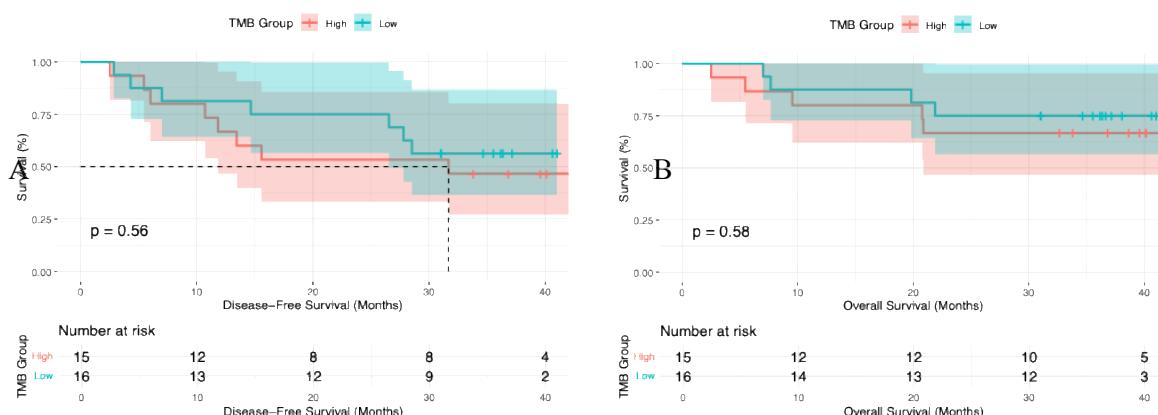


Figura 10: TMB alto vs bajo en relación con (A) la supervivencia libre de enfermedad y a (B) la supervivencia global

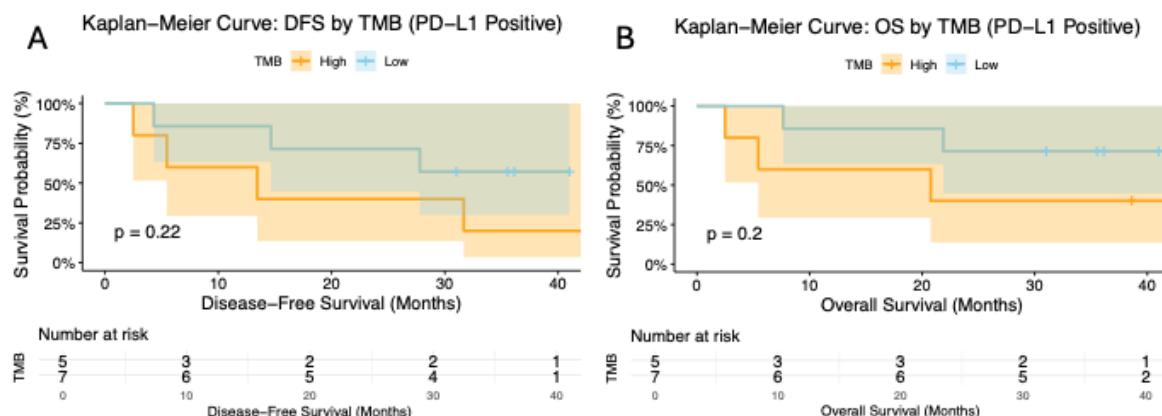
enfermedad (DFS) y supervivencia global (OS). La separación de la cohorte se estableció mediante la mediana del TMB (8,38) considerando por encima una carga mutacional alta (high) y por debajo un TMB bajo (low).

4.4.1 TMB vs DFS y OS

Los dos gráficos muestran una caída de la supervivencia tanto global, como libre de enfermedad, teniendo una leve mejora en pacientes con TMB bajo. Sin embargo, los valores p fueron superiores al umbral de significación estadística ($p>0,05$), por lo que no se consideran diferencias estadísticamente significativas.

4.4.2 Estratificación por PD-L1

PDL1 +



PD-L1 -

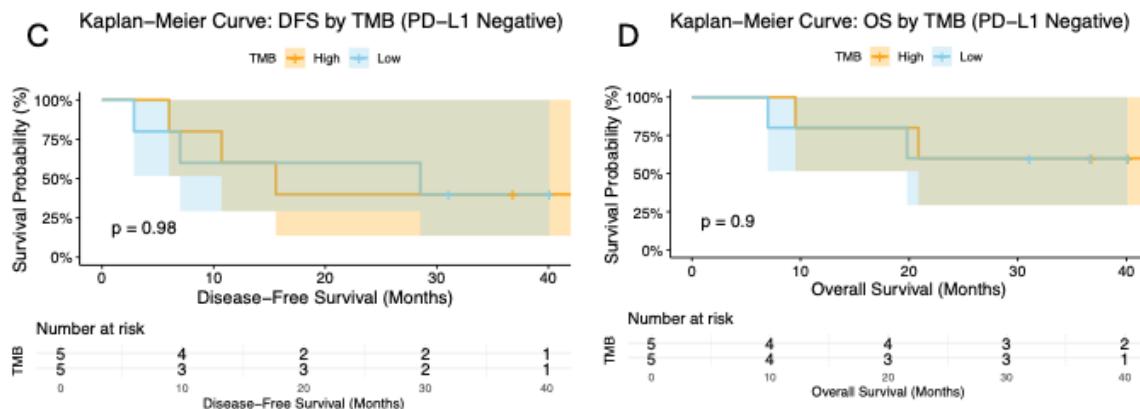


Figura 11: TMB alto vs bajo en PD-L1+ (A,B) y PD-L1- (C,D) en relación con la supervivencia libre de enfermedad y a la supervivencia global

Las curvas de Kaplan-Meier presentadas en la figura 11 representan la relación del TMB, el PD-L1 y la supervivencia tanto libre de enfermedad como total. No se observaron diferencias

estadísticamente significativas entre los grupos de TMB alto y bajo. Sin embargo, en el grupo PD-L1 positivo se observa una tendencia hacia mejor DFS y OS en pacientes con TMB bajo. El grupo con TMB alto muestra una caída más pronunciada en el porcentaje de supervivencia, tanto en DFS como en OS. Por otro lado, las curvas del grupo PD-L1 negativo se superponen considerablemente, lo que indica escasa discriminación pronóstica del TMB.

4.5 Análisis del TMB vs datos clínicos

4.5.1. TMB vs sexo

Para un análisis más extendido del TMB, se estudiaron sus tendencias con relación a diferentes datos clínicos. El test de Mann-Whitney U en la figura 12 compara el TMB entre sexos y los resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas ($p=0,62$). La distribución además no es muy uniforme y se observa que tanto hombres como mujeres presentan TMB altos y bajos.

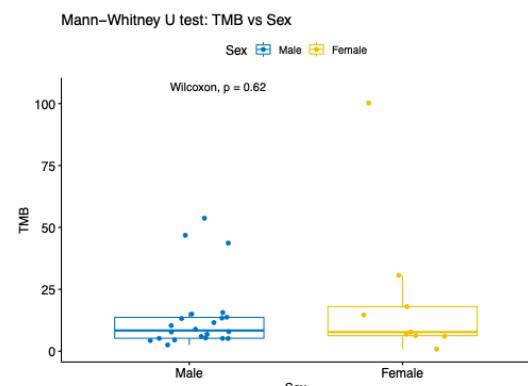


Figura 12: Mann-Whitney U Test: TMB en relación con el sexo

4.5.2 TMB vs Estadio patológico

Se analizó además la posible asociación entre la carga mutacional tumoral y el estadio patológico (IIA, IIB, IIIA) mediante el test de Kruskal-Wallis. El análisis muestra una diferencia cercana a la significación estadística ($p=0,06$), lo que sugiere una variación del TMB entre los estadios. Entre nuestros pacientes, el estadio más temprano registrado era IIA, teniendo el TMB más alto. Por lo contrario, los tumores en estadios (IIIA) avanzados mostraron valores de TMB más bajos. Se observa una tendencia, debido a que los pacientes en estadios IIB se concentran en valores de carga mutacional tumoral entre los pacientes en estadios anteriores y posteriores.

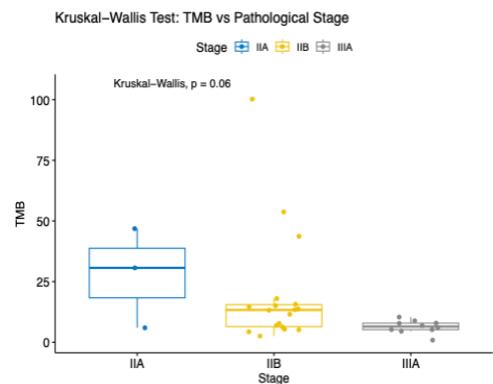


Figura 13: Kruskal-Walls Test: TMB en relación con el estadio patológico

4.5.3 TMB vs Expresión de PD-L1

Se observó a través de una prueba Kruskal-Wallis la relación entre el TMB y la expresión de PD-L1, dividiendo a los pacientes en tres grupos. Los grupos PD-L1 negativo parecen tener mayor

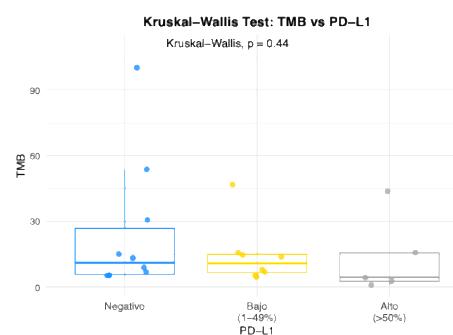


Figura 14: Kruskal-Walls Test: TMB en relación con la expresión de PD-L1

carga mutacional tumoral, aunque con mucha variación dentro de este grupo. Los pacientes de PD-L1 bajo, establecido por el porcentaje 1-49% parecen concentrarse más en un TMB inferior. El grupo de TMB alto, sin embargo, tiene ligeramente mayor dispersión, pero permaneciendo en valores de TMB más bajos.

5. Discusión

El objetivo principal del análisis del perfil mutacional y de la carga mutacional tumoral es encontrar biomarcadores para una mejor y más personalizada elección de tratamientos. En este trabajo se caracterizan las mutaciones de pacientes de la rama experimental del ensayo NADIM ADJUVANT que combina quimioterapia con immunoterapia, en concreto un inhibidor del punto de control immunitario PD-1 (Nivolumab).

La alta prevalencia de mutaciones en los genes KRAS, Tp53 y MET era como esperado, al ser los genes mayormente alterados en el cáncer de pulmón no microcítico, así como en la mayoría de los tipos de cáncer (Kumar & Kumar, 2022). Y es que cuando una célula sufre una mutación en un proto-oncogen, gen que en su estado normal regula el crecimiento y la división celular como KRAS y MET, se convierte en un oncogén y comienza a transformarse en una célula tumoral (Sherrie Pietranico-Cole, s. f.).

Esta patogenicidad también se refleja en nuestros resultados, debido a que 4/6 (67%) de las mutaciones en KRAS están registradas como patogénicas en ClinVar. KRAS, de la abreviación de oncogén homólogo al virus Kirsten de sarcoma de rata, es uno de los oncogenes más frecuentes en el ámbito de la oncología. KRAS^{G12C} es la mutación más común, también representada en nuestro

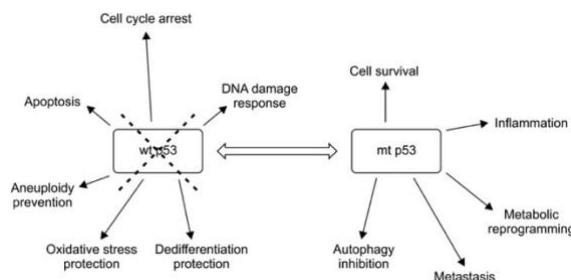


Figura 15: Función de la proteína p53 en su estado natural y repercusión en caso de estar mutada (Voutsadakis, 2021)

grupo de pacientes, y permanece hoy en día no tratable en cáncer de pulmón (Barghout et al., 2024). En primera línea de tratamiento la inhibición de puntos de control solo o en combinación con quimioterapia. Esto se debe a que las mutaciones en este gen estimulan el crecimiento celular en ausencia de EGF o tirosina

quinasas, por lo que inhibidores de estas moléculas no han resultado ser eficaces. Sin embargo, la immunoterapia frente a PD-1/PD-L1 sí ha resultado ser beneficioso (Voutsadakis, 2021), y dentro de nuestro grupo 2 pacientes que no han progresado podrían evidenciar dicha declaración.

Mutaciones en el gen supresor de tumores Tp53 representan eventos moleculares críticos en CPNM, contribuyendo a tumorigénesis y a mal pronóstico. Tp53 es el mayor indicador pronóstico

estudiado en este cáncer, siendo además el primer gen supresor de tumores descubierto (Voutsadakis, 2021). La figura 15 ilustra los mecanismos de la proteína p53, codificada por el gen en cuestión, utilizados para suprimir al tumor y frenar el crecimiento descontrolado en su estado natural (Voutsadakis, 2021). De forma mutada promueve la inflamación, evita la muerte celular por autofagia e incita la metástasis. Esto ha sido observado en muchos tipos de cáncer y las mutaciones en nuestro caso todas conllevan a pérdida de función de dicha proteína p53. Dado el papel fundamental de Tp53 en la defensa frente al cáncer, sus mutaciones se asocian con un pronóstico desfavorable, lo que también queda respaldado en nuestros resultados, siendo la mayoría de las mutaciones en Tp53 patogénicas (5/6, 83%) en ClinVar. Sin embargo, nuestros resultados afirman una buena respuesta de la mayoría de estos pacientes al tratamiento con quimio-inmunoterapia en el escenario adyuvante, lo que evidencia un beneficio significativo. Solamente 1/6 (17%) pacientes con mutTP53 positivo ha recaído en la enfermedad. Esto ha sido respaldado por diversos estudios, que han observado una mayor supervivencia en comparación con pacientes con tumores mutTP53 negativos, tras el tratamiento adyuvante en pacientes con estas alteraciones (Zhang et al., 2025). Esto sugiere que, aunque la mutación Tp53 es un marcador pronóstico negativo, podría actuar también como un biomarcador predictivo en respuesta favorable a la terapia adyuvante en pacientes con CPNM resecado. Para una conclusión sobre la eficacia como biomarcador predictivo en este estudio, se requiere una comparación con la rama control, de la que actualmente carecemos.

El receptor del factor de crecimiento hepatocitario (HGF), codificado por el oncogén de transición mesenquimal-epitelial (MET), es un receptor tirosina quinasa que impulsa la oncogénesis en muchos tipos diferentes de tumores (Li et al., 2008). 4 de 31 pacientes (13%) de nuestro estudio presentan una mutación en este gen, siendo este el tercero más alterado dentro de nuestra población, lo que encaja con las estadísticas de mutaciones en pacientes con CPNM (Kumar & Kumar, 2022). La activación de la vía MET está asociada con muchos cánceres y puede ser causada por sobreexpresión, amplificación de genes y mutaciones de omisión en el exón, que puede resultar de mutaciones puntuales o de inserciones o delecciones. En nuestro caso todas son variaciones de un solo nucleótido y uno de los pacientes presenta la mutación en el exón 14 MET, que se alinea con el porcentaje de la literatura de 3-4% de los pacientes con CPNM (Wolf et al., 2024).

Otra de las mutaciones a resaltar es la del gen que codifica el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), proteína que se encuentra en la superficie de las células y se une a EGF. Mutaciones en este gen, implican una mayor cantidad de proteínas EGFR en las células cancerosas y en consecuencia una multiplicación más rápida de estas (Li et al., 2008). La presencia de dicha mutación en un paciente del ensayo NADIM ADJUVANT, en cuyo protocolo se describe esta

mutación como criterio de exclusión. La razón de su participación puede recaer en diferentes causas. Por un lado, la detección de mutaciones previa a un ensayo tiene diversas limitaciones, debido a que se secuencia solo una sección del tumor, del cual el resultado puede no abarcar todas las mutaciones del paciente. Por otro lado, no se utilizan técnicas tan precisas como en investigación, siendo un análisis de NGS mucho más exacto y exhaustivo. En último lugar, las mutaciones más comunes en EGFR son la delección en el exón 19 y el cambio de leucina a arginina en la posición 858 en el exón 21 (Li et al., 2008), abarcando aproximadamente el 90% de mutaciones en este gen en CPNM. Sin embargo, la mutación registrada en nuestros resultados presenta a nivel proteico el cambio p.Asp761Asn y se trata de una mutación oncogénica rara. Este podría haber sido el motivo por el cual se desconocía la mutación en el paciente 31 antes de su inclusión en el estudio. Tras un análisis más profundo, en el cual se confirmó que la alteración está registrada como mutación probablemente patógenica, con una frecuencia del 10% de las lecturas, un p-valor de 0,00109 y que el paciente progresó a los 19 meses tras inicio de la adyuvancia, se tomó la decisión de retirar al paciente 31 del ensayo. Este tratamiento no es óptimo para pacientes EGFR mutado, debido a que estos ya tienen terapias más dirigidas como los inhibidores de tirosina quinasa registrados como tratamiento en primera línea. También es cierto, que dichos tratamientos son de alta especificidad a mutaciones en concreto, y que para la mutación de nuestro paciente no hay una terapia personalizada. Sin embargo, se ha demostrado que la inmunoterapia es poco eficaz en pacientes con mutaciones en el gen del receptor de factor de crecimiento epidérmico y otras alternativas deberían ser aplicadas (Zhou et al., 2022).

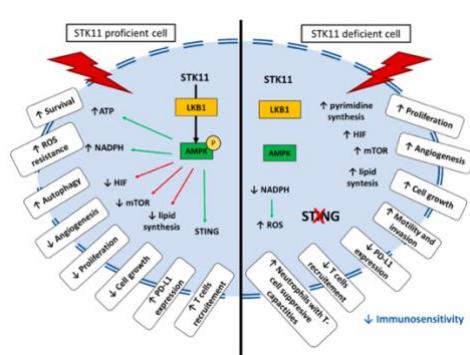


Figura 16: Diferencias funcionales entre células con expresión normal de STK11 (izquierda) y células deficientes en este gen (derecha) (Skoulidis et al., 2018)

Otras mutaciones relevantes son las de los pacientes 40 y 115 en el gen STK11 que llevan a la pérdida de función de dicha proteína. Se trata de un gen supresor tumoral que codifica LKB1, una quinasa de serina-treonina involucrada en el metabolismo celular, la regulación de la apoptosis y la respuesta a daños en el material genético (Laderian et al., 2020). La figura 16 muestra visualmente las funciones de STK11 dentro de una célula y la repercusión de la ausencia de esta proteína por causa de mutaciones genéticas. Se observa un aumento de proliferación y de la angiogénesis, favoreciendo el crecimiento del tumor. Todas las mutaciones en este estudio de STK11 resultan en una pérdida de función, lo que se ha descrito como oncogénico (Laderian et al., 2020), en parte por la pérdida de la regulación de mTOR por parte de AMPK. Se ha demostrado, además, que pacientes con estas alteraciones muestran una menor respuesta a inhibidores de PD-1

angiógeno, favoreciendo el crecimiento del tumor. Todas las mutaciones en este estudio de STK11 resultan en una pérdida de función, lo que se ha descrito como oncogénico (Laderian et al., 2020), en parte por la pérdida de la regulación de mTOR por parte de AMPK. Se ha demostrado, además, que pacientes con estas alteraciones muestran una menor respuesta a inhibidores de PD-1

(Skoulidis et al., 2018), como es Nivolumab. Esta es la razón por la cual no se recomienda su aplicación en pacientes afectados por estos cambios en STK11 y en NADIM ADJUVANT, al igual que mutaciones en ALK y KEAP1, forman parte de los criterios de exclusión. Sin embargo, se identificaron entre dos de nuestros pacientes estas alteraciones, y además una de ellas, la variación de un sólo nucleótido (A>T) en la posición 250, está registrada como patogénica. La segunda, presenta una delección desde la posición 236 hasta la 258 que ocasiona tanto un cambio a nivel proteico de isoleucina a lisina en la posición 79 como una terminación prematura por el cambio de marco de lectura 76 posiciones posteriores. Esta alteración de delección con frameshift resulta en una pérdida de función de LKB1 y por lo tanto una menor inmunosensibilidad. Dado que ninguno de los pacientes ha progresado por el momento, todavía no se ha tomado una decisión sobre la continuidad de estos pacientes en el estudio por el momento.

Adicionalmente, los pacientes con mutaciones en el gen BRAF fueron observados con mayor exhaustividad, debido a la reciente relación descubierta de dichas mutaciones con buen pronóstico para CPNM avanzado y localmente avanzado tras tratamiento basado en inmunoterapia (Provencio et al., 2024). Parecida a las funciones de las proteínas anteriores, B-raf participa en el envío de señales que controlan el crecimiento celular y se ha descubierto que muchos cánceres (como el melanoma) humanos presentan mutaciones en el gen que codifica por esta proteína (Davies et al., 2002). Como sugerido en estudios previos, se demuestra aquí también la sensibilidad frente a inhibidores de puntos de control de CPNM BRAF positivo (Provencio et al., 2024). El paciente 23, que además presenta co-mutación de KRAS, otro marcador de buen pronóstico no ha registrado recaída ni muerte. Por otro lado, surgen dudas sobre el marcador, debido a que el paciente 141 con mutación diferente, pero en el mismo gen, progresó a los aproximadamente 12 meses tras el comienzo del tratamiento adyuvante. Sin embargo, esto puede deberse a la co-mutación en este caso de ERBB2. El cáncer de pulmón de células no pequeñas con mutación en ERBB2 ha sido demostrada ser una condición desafiante con un pronóstico generalmente desfavorable (EnsayosClinicos.es, s. f.). Los estudios respaldan la evidencia de que la sobreexpresión de este gen resulta en peores respuestas a la inmunoterapia. Esta puede ser la razón del caso de BRAF positivo, que aun siendo de buen pronóstico, el paciente haya recaído por la presencia de la co-mutación en ERBB2.

En cuanto al valor numérico de la carga mutacional, se puede observar que por el momento no se han conseguido diferencias significativas entre los grupos de alto y bajo TMB, por lo que no se puede asociar a mayor o menor supervivencia. La estratificación de PD-L1 tampoco ha resultado en ninguna relevante diferencia, por lo que respalda la sugerencia de otros estudios previos de PD-L1 no ser un buen biomarcador predictivo (Vranic & Gatalica, 2022). Esto también puede deberse

a que las pruebas de PD-L1 tienen sus limitaciones, debido a que solo se analiza parte del tumor. Puede coincidir que no presente la molécula a detectar, pero que en otras partes del tumor sí que esté presente y resulte en un falso negativo.

Con relación a los datos clínicos, el análisis con el sexo de los pacientes no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0,62$), lo que indica que el sexo no parece estar asociado con una variación relevante en la carga mutación en esta cohorte. Por otro lado, el análisis comparativo del estado patológico con el TMB sí que ha demostrado tener significancia estadística, lo que sugiere una variación de la carga mutacional entre estadios. Este patrón podría estar relacionado con una mayor inmunogenicidad del tumor en fases iniciales, donde TMB más elevado favorece su reconocimiento por el sistema inmune y limita la progresión. Por lo contrario, los tumores en estadios avanzados mostraron valores de TMB más bajos, lo que podría reflejar una menor presentación de neoantígenos y, por lo tanto, una mayor capacidad de evasión del sistema inmune.

A pesar de que la mayoría de los resultados relacionados con la carga mutacional no han mostrado significancia estadística, hay que resaltar la importancia de la técnica de secuenciación, debido al interés del análisis del perfil mutacional. Este estudio detallado de las mutaciones ha permitido observar diferencias en las respuestas a la quimio-inmunoterapia adyuvante. Además, el análisis mediante NGS tiene implicaciones directas, como hemos podido percibir con el hallazgo de la mutación en el gen EGFR y en las diferentes respuestas con posible asociación a las mutaciones descritas.

Este estudio se alinea con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de las Naciones Unidas, al promover un abordaje más personalizado y eficiente del cáncer de pulmón, contribuyendo a la sostenibilidad del sistema sanitario mediante la reducción de tratamientos innecesarios y efectos adversos derivados de terapias poco dirigidas.

6. Conclusiones

- 1.** No hay una asociación significativa entre la carga mutacional tumoral y la supervivencia tanto libre de enfermedad como total en pacientes de cáncer de pulmón no microcítico tras el tratamiento adyuvante con quimio-inmunoterapia.
- 2.** La secuenciación de nueva generación (NGS) mediante un panel amplio permite identificar mutaciones relevantes con interés clínico en comparación con técnicas convencionales.
- 3.** Las alteraciones en KRAS, Tp53 o MET no se asocian con diferencias significativas en la supervivencia en el contexto del tratamiento adyuvante con quimio-inmunoterapia en cáncer de pulmón no microcítico.

10. Bibliografía

AEACAP - Asociación Española de Afectados de Cáncer de Pulmón. (2025).

Información sobre biomarcadores—AEACAP - Asociación Afectados Cáncer de Pulmón.

American Cancer Society. (25d. C.). *Inmunoterapia contra el cáncer de pulmón /*

Inhibidores de puntos de control inmunológico.

American Cancer Society. (2025). *Tratamiento contra el cáncer de pulmón no microcítico según la etapa / American Cancer Society.*

Association internationale pour l'étude du cancer du poumon (Ed.). (2010).

Principles and practice of lung cancer: The official reference text of the IASLC (4th ed). Wolters Kluwer health - Lippincott Williams & Wilkins.

Billan, S., Kaidar-Person, O., & Gil, Z. (2020). Treatment after progression in the era of immunotherapy. *The Lancet Oncology*, 21(10), e463-e476.

[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30328-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30328-4)

Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229-263.

<https://doi.org/10.3322/caac.21834>

Calvo, V., Domíne, M., Sullivan, I., González-Larriba, J.-L., Ortega, A. L., Bernabé, R., Sala, M. A., Campos, B., De Castro, J., Martínez-Martorell, P., Bosch-Barrera, J., Mielgo, X., Vila, L., Casal, J., Ros, S., Martínez Aguiló, M.,

Padilla, A., Sandiego, S., Aires Machado, J., & Provencio-Pulla, M. (2021).

A phase III clinical trial of adjuvant chemotherapy versus chemoimmunotherapy for stage IB-IIIA completely resected non-small cell lung cancer (NSCLC) patients nadim-adjuvant: New adjuvant trial of chemotherapy versus chemoimmunotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 39(15_suppl), TPS8581-TPS8581.

https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.TPS8581

Cancer Research Institute. (s. f.). *Immunotherapy for Lung Cancer—Cancer Research Institute*.

ClinicalTrials.gov. (s. f.). *New Adjuvant Trial of Chemotherapy vs Chemoimmunotherapy (NADIM-ADJUVANT)—NCT04564157* (NCT04564157).

<https://clinicaltrials.gov/study/NCT04564157?id=NCT04564157&rank=1>

Garcí'a-Campelo, R., Bernabe', R., Cobo, M., Corral, J., Coves, J., Do'mine, M., Nadal, E., Rodriguez-Abreu, D., Vin'olas, N., & Massuti, B. (2015). SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) 2015. *Clinical and Translational Oncology*, 17(12), 1020-1029.

<https://doi.org/10.1007/s12094-015-1455-z>

Huang, A.-L., He, Y.-Z., Yang, Y., Pang, M., Zheng, G.-P., & Wang, H.-L. (2024). Exploring the potential of the TCR repertoire as a tumor biomarker (Review). *Oncology Letters*, 28(3), 413.

<https://doi.org/10.3892/ol.2024.14546>

Huang, Q., Kemnade, J., Cornwell, L., Kheradmand, F., Sabichi, A. L., & Das, D.

(2022). Non-small cell lung cancer in the era of immunotherapy.

Seminars in Oncology, 49(3-4), 337-343.

<https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2022.06.009>

Instituto Nacional del Ca'ncer. (2020, junio). *Inhibidores de puntos de control inmunitario*. Instituto Nacional del Ca'ncer.

<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia/inhibidores-de-puntos-de-control>

International Agency for Research on Cancer (IARC). (s. f.). *Global Cancer Observatory – Cancer Today: Distribution of cancer types*. World Health Organization.

https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=cancer&group_populations=1&populations=903_904_905_908_909_935&types=1

Know Your Biomarker. (2022). *Tumor Mutational Burden*.

Lemjabbar-Alaoui, H., Hassan, O. U., Yang, Y.-W., & Buchanan, P. (2015). Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1856(2), 189-210. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.08.002>

National Cancer Institute. (2025). *Tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas (PDQ®)*.

<https://www.cancer.gov/espanol/tipos/pulmon/pro/tratamiento-pulmon-celulas-no-pequenas-pdq1>

Nowell, P. C. (1976). The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations: Acquired genetic liability permits stepwise selection of variant sublines and underlies tumor progression. *Science*, 194(4260), 23-28.

<https://doi.org/10.1126/science.959840>

Organizació n Mundial de la Salud. (s. f.). *Cáncer de pulmón*.

<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/lung-cancer>

Patel, S. P., & Kurzrock, R. (2015). PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(4), 847-856. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0983>

Phillips, W. J., Jackson, A., Kidane, B., Lim, G., Navani, V., & Wheatley-Price, P. (2025). Immunotherapy for Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer: A Practical Guide of Current Controversies. *Clinical Lung Cancer*, 26(3), 179-190. <https://doi.org/10.1016/j.cllc.2025.01.006>

Provencio, M., Calvo, V., Romero, A., Spicer, J. D., & Cruz-Bermudez, A. (2022). Treatment Sequencing in Resectable Lung Cancer: The Good and the Bad of Adjuvant Versus Neoadjuvant Therapy. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 42, 711-728.

https://doi.org/10.1200/EDBK_358995

Provencio, M., Nadal, E., Insa, A., Garcí a Campelo, R., Casal, J., Do mine, M., Massuti, B., Majem, M., Rodrí guez-Abreu, D., Martínez-Martí, A., De Castro, J., Go mez De Antonio, D., Macia, I., Figueroa, S., Fernández Vago, L., Calvo, V., Palmero, R., Sierra-Rodero, B., Martínez-Toledo, C., ... Cruz-

- Bermúdez, A. (2024). Perioperative chemotherapy and nivolumab in non-small-cell lung cancer (NADIM): 5-year clinical outcomes from a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 25(11), 1453-1464. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(24\)00498-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(24)00498-4)
- Roche Pacientes. (s. f.). *Cáncer de pulmón no microcítico*.
<https://rochepacientes.es/cancer/pulmon/no-microcitic.html>
- Rossi, S., Pagliaro, A., Michelini, A., Navarria, P., Clerici, E., Franceschini, D., Toschi, L., Finocchiaro, G., Scorsetti, M., & Santoro, A. (2023). The Era of Immunotherapy in Small-Cell Lung Cancer: More Shadows Than Light? *Cancers*, 15(24), 5761. <https://doi.org/10.3390/cancers15245761>
- Sociedad Espan~ola de Oncologí~a Me~dica (SEOM). (s. f.). *Las cifras del cáncer en España 2025*. <https://seom.org/prensa/el-cancer-en-cifras>
- World Health Organization. (s. f.). *Cancer*. https://www.who.int/es/health-topics/cancer#tab=tab_1
- Barghout, S. H., Zhan, L. J., Raptis, S., Al-Agha, F., Esfahanian, N., Popovacki, A., Kasymjanova, G., Proulx-Rocray, F., Chan, S. W. S., Richardson, M., Brown, M. C., Patel, D., Dean, M. L., Navani, V., Moore, E., Carvery, L., Yan, E., Goldshtein, D., Cleary-Gosine, J., ... Snow, S. (2024). Treatment patterns and outcomes in KRAS-positive advanced NSCLC patients previously treated with immune checkpoint inhibitors: A Canada-wide real-world, multi-center, retrospective cohort study. *Lung Cancer*, 194, 107898.
<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2024.107898>

- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., ... Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949-954. <https://doi.org/10.1038/nature00766>
- EnsayosClinicos.es. (s. f.). *HER2-mutant non-small cell lung cancer*. EnsayosClinicos.es. <https://ensayosclinicos.es/enfermedad/her2-mutant-non-small-cell-lung-cancer-2/>
- Forde, P. M., Spicer, J. D., Provencio, M., Mitsudomi, T., Awad, M. M., Wang, C., Lu, S., Felip, E., Swanson, S. J., Brahmer, J. R., Kerr, K., Taube, J. M., Ciuleanu, T.-E., Tanaka, F., Saylors, G. B., Chen, K.-N., Ito, H., Liberman, M., Martin, C., ... Girard, N. (2025). Overall Survival with Neoadjuvant Nivolumab plus Chemotherapy in Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2502931>
- Kumar, A., & Kumar, A. (2022). Non-small-cell lung cancer-associated gene mutations and inhibitors. *Advances in Cancer Biology - Metastasis*, 6, 100076. <https://doi.org/10.1016/j.adcanc.2022.100076>
- Laderian, B., Mundi, P., Fojo, T., & E. Bates, S. (2020). Emerging Therapeutic Implications of *STK11* Mutation: Case Series. *The Oncologist*, 25(9), 733-737. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2019-0846>
- Li, A. R., Chitale, D., Riely, G. J., Pao, W., Miller, V. A., Zakowski, M. F., Rusch, V., Kris, M. G., & Ladanyi, M. (2008). EGFR Mutations in Lung Adenocarcinomas. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 10(3), 242-248.

<https://doi.org/10.2353/jmoldx.2008.070178>

Provencio, M., Robado De Lope, L., Serna-Blasco, R., Nadal, E., Diz Tain, P., Massuti, B., González-Larriba, J. L., Insa, A., Sánchez-Hernández, A., Casal-Rubio, J., García-Campelo, R., Sequero López, S., Rogado, J., Martínez-Martí, A., Bosch-Barrera, J., Bernabé, R., Vázquez Estévez, S., Ponce, S., De Castro, J., ... Romero, A. (2024). BRAF mutational status is associated with survival outcomes in locally advanced resectable and metastatic NSCLC.

Lung Cancer, 194, 107865. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2024.107865>

Sherrie Pietranico-Cole. (s. f.). *Proto-oncogenes to Oncogenes to Cancer*. Nature Scitable.

Siddique, F., Shehata, M., Ghazal, M., Contractor, S., & El-Baz, A. (2024). Lung Cancer Subtyping: A Short Review. *Cancers*, 16(15), 2643.
<https://doi.org/10.3390/cancers16152643>

Skoulidis, F., Goldberg, M. E., Greenawalt, D. M., Hellmann, M. D., Awad, M. M., Gainor, J. F., Schrock, A. B., Hartmaier, R. J., Trabucco, S. E., Gay, L., Ali, S. M., Elvin, J. A., Singal, G., Ross, J. S., Fabrizio, D., Szabo, P. M., Chang, H., Sasson, A., Srinivasan, S., ... Heymach, J. V. (2018). *STK11/LKB1 Mutations and PD-1 Inhibitor Resistance in KRAS-Mutant Lung Adenocarcinoma*. *Cancer Discovery*, 8(7), 822-835.

<https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-18-0099>

Voutsadakis, I. A. (2021). Mutations of p53 associated with pancreatic cancer and therapeutic implications. *Annals of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 25(3), 315-327. <https://doi.org/10.14701/ahbps.2021.25.3.315>

Vranic, S., & Gatalica, Z. (2022). PD-L1 testing by immunohistochemistry in

Immuno-Oncology. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences.*

<https://doi.org/10.17305/bjbms.2022.7953>

Wolf, J., Hochmair, M., Han, J.-Y., Reguart, N., Souquet, P.-J., Smit, E. F., Orlov, S.

V., Vansteenkiste, J., Nishio, M., De Jonge, M., Akerley, W., Garon, E. B.,

Groen, H. J. M., Tan, D. S. W., Seto, T., Frampton, G. M., Robeva, A.,

Carbini, M., Le Mouhaer, S., ... Heist, R. S. (2024). Capmatinib in MET exon

14-mutated non-small-cell lung cancer: Final results from the open-label,

phase 2 GEOMETRY mono-1 trial. *The Lancet Oncology*, 25(10), 1357-1370.

[https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(24\)00441-8](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(24)00441-8)

Zhang, C., Yang, C., & Shi, Q. (2025). Effects of Tp53 Gene Mutations on the

Survival of Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC); A Short Review. *Cancer Management and Research, Volume 17*, 65-82.

<https://doi.org/10.2147/cmar.s495006>

Zhou, S., Ren, F., & Meng, X. (2022). Efficacy of immune checkpoint inhibitor

therapy in EGFR mutation-positive patients with NSCLC and brain

metastases who have failed EGFR-TKI therapy. *Frontiers in Immunology*, 13.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.955944>

11. Anexo

11.1 Figuras Suplementarias

Tabla 1: Resultados qPCR: Concentración de las librerías generadas

Sample Name	Mean conc	[conc]
238	0,046816475	23,40823768
59	0,104493273	52,24663663
75	0,931732575	465,8662875
82	2,97785974493475	1488,929872
31	0,10274289	51,37144477
115	1,61591509176511	807,9575459
66	0,046764172	23,38208597
8	0,160752467	80,37623364
43	0,692133043	346,0665215
53	0,290043611	145,0218056
131	0,979612466	489,8062331
217	1,25026473243175	625,1323662
94	0,114604287	57,30214368
47	0,450682601	225,3413003
18	0,975582607	487,7913037
29	0,181933373	90,9666864
144	0,957598415	478,7992075
205	0,95114255	475,5712748
2	0,282180521	141,0902607
129	0,492555523	246,2777616
17	0,442674813	221,3374063
57	0,43086267	215,4313348
110	0,389915584	194,9577922
141	0,646879587	323,4397933
40	0,4166694	208,3346998
98	0,777693868	388,8469341
117	1,922699808249520	961,3499041
202	0,48884046	244,42023
123	0,342772681	171,3863406
128	0,380935693	190,4678464
112	0,092443475	46,22173761
32	2,358741508591690	1179,370754
97	0,722567332	361,2836658
186	0,216029183	108,0145914
156	2,89705397646582	1448,526988
23	0,375434921	187,7174607
21	0,141818253	70,90912651
160	0,235152809	117,5764045
71	0,103940343	51,97017151

Tabla 2: Datos del Ion Reporter para el OncoPrint

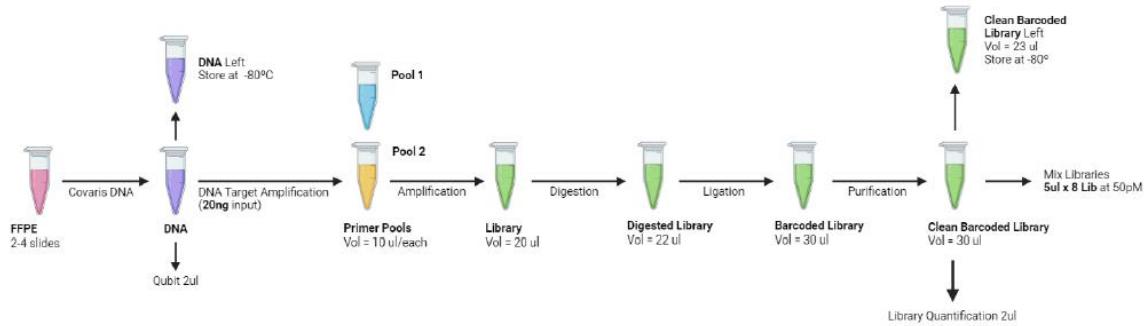
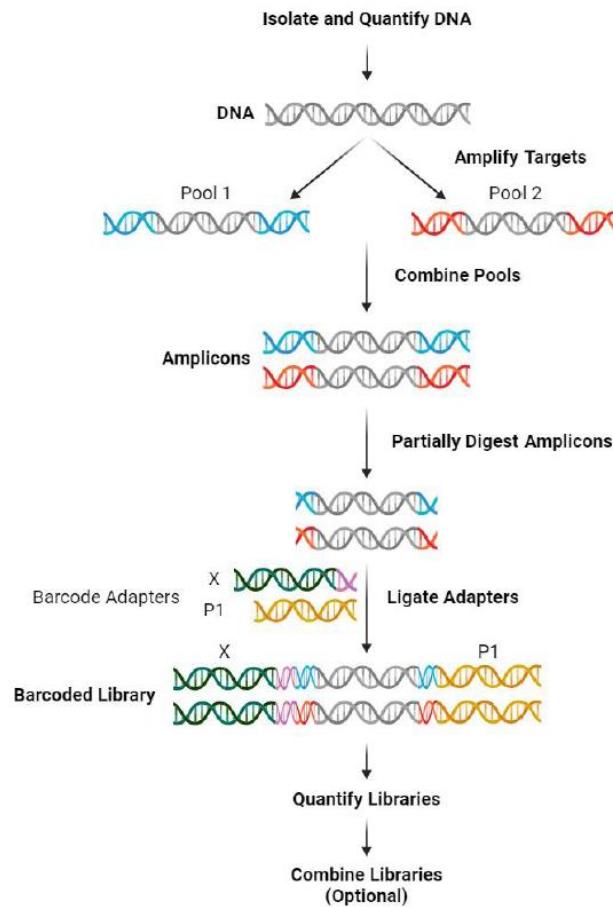
ID_Patient	Sample_date	Extraction method	Sample type	visit	Disease progression	PFS	TMB	Gene	Coding transcript change	Protein change	Transcript	Rotype
2	70002	Covaris	FFPE	Surgery	1	27,794661	6,89	FANCD2	c.3019A>T	p.Arg1007Ter	NM_033084,6	SNV
2	70002	Covaris	FFPE	Surgery	1	27,794661	6,89	KRAS	c.34G>T	p.Gly12Cys	NM_033360,4	SNV
2	70002	Covaris	FFPE	Surgery	1	27,794661	6,89	NF1	c.5305C>T	p.Arg1799Ter	JM_001042492;	SNV
8	5500008	Covaris	FFPE	Surgery	1	15,572895	30,66	No variants				
17	800017	Covaris	FFPE	Surgery	0	42,283368	18,02	HNF1A	c.341G>A	p.Arg114His	NM_000545,8	SNV
17	800017	Covaris	FFPE	Surgery	0	42,283368	18,02	HNF1A	c.864delG	p.Pro191GlnfsTer51	NM_000545,8	INDEL
17	800017	Covaris	FFPE	Surgery	0	42,283368	18,02	TP53	c.818G>T	p.Arg273Leu	NM_000546,6	SNV
18	100018	Covaris	FFPE	Surgery	0	42,414784	43,68	No variants				
21	100021	Covaris	FFPE	Surgery	1	6,0123203	100,24	HNF1A	c.864delG	p.Pro291GlnfsTer51	NM_000545,8	INDEL
23	5500023	Covaris	FFPE	Surgery	0	37,125257	6,03	BRAF	c.138T>G	p.Ile63Val	NM_004333,6	SNV
23	5500023	Covaris	FFPE	Surgery	0	37,125257	6,03	KRAS	c.34G>C	p.Gly12Arg	NM_033360,4	SNV
29	800029	Covaris	FFPE	Surgery	1	31,671458	46,83	No variants				
31	800031	Covaris	FFPE	Surgery	1	19,219713	224,64	PM22	c.943C>T	p.Arg315Ter	NM_000553,7	SNV
31	800031	Covaris	FFPE	Surgery	1	19,219713	224,64	EGFR	c.2291G>A	p.Asp761Asn	NM_005228,5	SNV
31	800031	Covaris	FFPE	Surgery	1	19,219713	224,64	KRAS	c.35G>C	p.Gly12Ala	NM_033360,4	SNV
31	800031	Covaris	FFPE	Surgery	1	19,219713	224,64	CDK12	c.314C>T	p.Arg104Ter	NM_016507,4	SNV
31	800031	Covaris	FFPE	Surgery	0	41,002053	5,19	NOTCH1	c.3055C>T	p.Gln1019Ter	NM_017617,5	SNV
32	900032	Covaris	FFPE	Surgery	0	41,002053	5,19	TP53	c.548G>G	p.Ser183Ter	NM_000546,6	SNV
40	1600040	Covaris	FFPE	Surgery	0	42,414784	53,74	TE2	c.3781C>T	p.Arg1261Cys	JM_01127208;	SNV
40	1600040	Covaris	FFPE	Surgery	0	42,414784	53,74	MET	c.504G>T	p.Glu168Asp	NM_001127250;	SNV
40	1600040	Covaris	FFPE	Surgery	0	42,414784	53,74	STK11	c.250A>T	p.Lys84Ter	NM_004475,5	SNV
43	2800043	Covaris	FFPE	Surgery	1	6,9979466	5,36	MET	c.504G>T	p.Glu168Asp	JM_01127250;	SNV
43	2800043	Covaris	FFPE	Surgery	1	6,9979466	5,36	KRAS	c.183A>C	p.Gln61His	NM_033360,4	SNV
47	7200047	Covaris	FFPE	Surgery	0	40,607803	5,97	MET	c.3082G>T	p?	JM_01127250;	SNV
53	200053	Covaris	FFPE	Surgery	1	14,652977	4,31	No variants				
57	2800057	Covaris	FFPE	Surgery	0	40,082236	8,86	No variants				
75	800075	Covaris	FFPE	Surgery	0	39,556468	10,37	CDKN2A	c.241G>T	p.Gly81Cys	NM_006164,5	SNV
75	800075	Covaris	FFPE	Surgery	0	39,556468	10,37	TP53	c.701A>G	p.Asp108His	JM_01195132;	SNV
75	800075	Covaris	FFPE	Surgery	0	39,556468	10,37	CDKN2A	c.322G>C	p.Tyr234Cys	NM_00546,6	SNV
75	800075	Covaris	FFPE	Surgery	0	39,556468	10,37	TP53	c.701A>G	p.Glu1102Asp	NM_015338,6	SNV
75	800075	Covaris	FFPE	Surgery	0	39,556468	10,37	ASXL1	c.3386G>T	p.Gly12Asp	NM_033360,4	SNV
82	100082	Covaris	FFPE	Surgery	1	26,546201	7,75	KRAS	c.35G>A	c.701A>G	NM_022552,5	INDEL
94	3800094	Covaris	FFPE	Surgery	1	28,517454	5,16	TP53	c.1021C>T	p.Arg341Ter	NM_000546,6	SNV
97	100097	Covaris	FFPE	Surgery	0	36,139363	0,87	No variants				
110	800310	Covaris	FFPE	Surgery	0	33,806982	13,41	KRAS	c.35G>T	p.Gly12Val	NM_033360,4	SNV
115	100115	Covaris	FFPE	Surgery	0	36,336756	7,79	STK11	c.256delTCCTCAAGAACAGAGT	p.Ile79LysfsTer76	NM_000448,4	INDEL
115	100115	Covaris	FFPE	Surgery	0	36,336756	7,79	MAPK1	c.964G>A	p.Glu322Lys	NM_017617,5	SNV
117	500117	Covaris	FFPE	Surgery	0	34,661191	6,29	DNMT3A	c.1223_1227delATATGG	p.Glu408GlnfsTer11	NM_006164,5	INDEL
117	500117	Covaris	FFPE	Surgery	0	34,661191	6,29	TP53	c.818G>C	p.Arg347Pro	NM_000546,6	SNV
123	2800123	Covaris	FFPE	Surgery	0	36,796715	13,21	No variants				
128	9400128	Covaris	FFPE	Surgery	0	35,5154	4,55	MET	c.2962C>T	p.Arg980Cys	JM_01127208;	SNV
128	9400128	Covaris	FFPE	Surgery	0	35,5154	4,55	NOTCH1	c.3250G>T	p.Glu1084Ter	NM_017617,5	SNV
129	3500129	Covaris	FFPE	Surgery	1	10,710472	15,04	PIK3CA	c.3049G>C	p.Asp1017His	NM_006218,4	SNV
131	1400131	Covaris	FFPE	Surgery	1	5,4537988	14,63	No variants				
141	5300141	Covaris	FFPE	Surgery	1	11,827515	11,57	BRAF	c.1742A>G	p.Asn581Ser	NM_004333,6	SNV
141	5300141	Covaris	FFPE	Surgery	1	11,827515	11,57	ERBB2	c.2313_2324del	p.Tyr772_Ala775dup	NM_004448,4	INDEL
144	700144	Covaris	FFPE	Surgery	0	31,047228	5,2	TP53	c.404G>A	p.Oys135Ter	NM_00546,6	SNV
156	700156	Covaris	FFPE	Surgery	0	31,014374	2,56	ERBB2	c.2313_2324del	p.Tyr772_Ala775dup	NM_004448,4	INDEL
186	2800186	Covaris	FFPE	Surgery	1	4,3039014	7,9	NFE2L2	c.100G>G	p.Arg34Gly	NM_006164,5	SNV
186	2800186	Covaris	FFPE	Surgery	1	4,3039014	7,9	PTPN11	c.1505C>T	p.Ser502Leu	NM_002834,5	SNV
202	1700202	Covaris	FFPE	Surgery	1	2,4969199	15,66	NFE2L2	c.101G>T	p.Arg341Leu	NM_006164,5	SNV
202	1700202	Covaris	FFPE	Surgery	1	2,4969199	15,66	TP53	c.916G>T	p.Arg306Ter	NM_000546,6	SNV
205	700205	Covaris	FFPE	Surgery	1	13,437372	13,76	No variants				
217	800217	Covaris	FFPE	Surgery	1	2,8583162	6,88	TE12	c.2349delA	p.Glu723AspfsTer20	JM_01127208;	INDEL

Tabla 3: La clasificación TNM del cáncer de pulmón no microcítico

ESTADIO DEL CÁNCER DE PULMÓN	TUMOR PRIMARIO	AFECTACIÓN DE GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES	METÁSTASIS A DISTANCIA
CARCINOMA OCULTO	Tx	N0	M0
0	Tis (in situ)	N0	M0
IA1	T1a	N0	M0
IA2	T1b	N0	M0
IA3	T1c	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
IIIB	T1a-c	N1	M0
	T2a-b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1a-c	N2	M0
	T2a-b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0/1	M0
IIIB	T1a-c	N3	M0
	T2a-b	N3	M0
	T3	N2	M0
	T4	N2	M0
IIIC	T3	N3	M0
	T4	N3	M0
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a/M1b
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1c

11.2 Protocolos

Protocolo 1: Tumor Mutation Load (TML)



GENERACIÓN DE LIBRERÍAS

Para la generación de librerías se utiliza el kit **Oncomine Tumor Mutation Load Assay (DNA)** (Cat. No. A37909) compuesto de **2 elementos** el **Primer Panel** y el **Kit Ampliseq**. Para este utilizaremos los barcodes de **Ion Torrent™ Dual Barcode Kit 1-96** (que vienen por separado, Cat. No. A39360).

Contents	Amount	Storage
Oncomine™ Tumor Mutation Load Assay – Manual Library Preparation primer panel (Part No. A37907, 24 reactions)		
Oncomine™ Tumor Mutation Load Assay (2X) (blue cap) (pool 1 of 2)	120 µL	–30°C to –10°C
Oncomine™ Tumor Mutation Load Assay (2X) (blue cap) (pool 2 of 2)	120 µL	
Ion AmpliSeq™ Library Kit Plus (Part No. 4488990)		
5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix (red cap)	120 µL	–30°C to –10°C
FuPa Reagent (brown cap)	48 µL	
Switch Solution (yellow cap)	96 µL	
DNA Ligase (blue cap)	48 µL	
25X Library Amp Primers (pink cap)	48 µL	
1X Library Amp Mix (black cap)	1.2 mL	
Low TE	6 mL	15°C to 30°C ^[1]

^[1] Can be stored at –30°C to –10°C for convenience.

1. PRE-TRATAMIENTO DEL DNA CON UDG:

Nota: La enzima UDG nos permite reparar el DNA y de esta manera evitar artefactos en la secuenciación de mutaciones. Por lo tanto, antes de generar las librerías pretratamos el DNA con esta enzima y luego la desactivamos a través de una temperatura específica para que no afecte el resto de reacciones (digestión de los primers).

La enzima UDG no viene en el kit de TML, se vende por separado. **IMPORTANTE:** Comprar la termolábil para poder desactivarla tras el tratamiento del DNA. Ref. Thermo: 78310100UN.

Utilizar Veriti™ 96-well Thermal Cycler (Folder Alberto, Programa TML UDG)

Protocolo:

Component	Volume
20 ng FFPE DNA	≤6.5 µL
UDG, heat-labile	1 µL
Low TE	Volumen Final = 7,5µl

1. Limpiar la zona con EtOH 70%. Encender Veriti para que se vaya calentando la tapa.
2. Descongelar las muestras de DNA en hielo. Mezclar a toques con el dedo y spin a las muestras. Descongelar la enzima UDG y el Low TE.
3. Añadir a cada tubo el volumen de Low TE correspondiente según lo calculado.
4. Añadir la muestra (DNA) a cada tubo según lo calculado. Si hay que añadir menos de 1µl, hacer una dilución 1/5 de la muestra (2µl RNA + 8µl H₂O).
5. Añadir a cada tubo 1µl de la enzima UDG.
6. Vórtex y spin a la tira de muestras.
7. Colocar los adaptadores en la placa del Veriti (2 tubos de 0,2 ml en dos esquinas opuestas + 1 tubo de 0,2 ml en las otras dos esquinas opuestas).
8. Colocar la tira de muestras en el centro y correr el siguiente programa:

Temperature	Time
37°C	2 minutes
50°C	10 minutes
4°C	Hold (≤1 hour)

9. Descongelar en hielo los siguientes reactivos: **Oncomine™ TML Assay 2X Primer Pools (Pool 1 y 2, tapas azules)** y el **5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix (tapa roja)**.

2. AMPLISEQ. GENERACIÓN DE AMPLOCONES PARA LA LIBRERÍA:

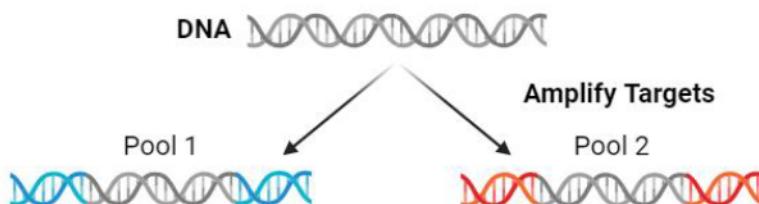
Nota: La cantidad de DNA que se utiliza para generar las librerías posteriores, es clave para poder identificar el mayor número de mutaciones distintas. Existe una situación de compromiso entre el número de muestras que puedes leer para alcanzar una profundidad adecuada y la cantidad de DNA inicial que aporte diversidad suficiente. Mucho DNA leído con poca profundidad identificaría pocas mutaciones. En cambio, poco DNA tiene poca diversidad, y aunque lo leyeras de forma muy profunda tampoco identificarías muchas mutaciones.

Los primers del Panel y la Polimera HiFi son muy viscosos, pipetear despacio asegurando que se recoge el volumen correcto. **Vortexear bien!** La cantidad de DNA tiene que ser la misma en todas las muestras.

Nosotros vamos a leer unas 8 librerías distintas en el mismo Chip 540.

Utilizar tiras de tubos 0,2 ml con tapón plano. Ref. Cultek: 87FG-088WF.

Utilizar Veriti™ 96-well Thermal Cycler (Folder Alberto, Programa TML Ampliseq)



Esta parte consiste en amplificar mediante PCR determinadas regiones de interés del DNA, en este caso las mutaciones tumorales. La reacción se realiza en **dos pools diferentes de primers** con un volumen final de **10µl cada uno**. El input de DNA para la librerías será de **20ng**. Hay un volumen disponible máximo de **7.5µl para DNA**, para aquellas muestras que no alcanzan la concentración suficiente para llegar a los 20ng, añadir 7.5µl de DNA indiferentemente de su concentración. **No se hace Master Mix**, porque se desconoce si los reactivos son limitantes.

Component	Volume
5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix (red cap)	5 µL
DNA (20 ng) ^[1] UDG-Treated DNA	≤7.5 µL
Nuclease free Water	to 12.5 µL

[1] Substitute 5 µL AcroMetrix™ Oncology Hotspot Control to prepare a control library.

Cálculos:

$$Vol_{DNA} = \frac{m_{DNA}}{[DNA]} = \frac{20 \text{ ng}}{x \text{ ng}/\mu\text{L}} \quad \text{Siendo } X \text{ la concentración de DNA de la muestra medida en Qubit.}$$

$$Vol_{H2O} = Vol_{TOTAL} - Vol_{DNA} = 7.5 \mu\text{l} - Vol_{DNA}$$

Protocolo:

1. Spin a las muestras.
2. Añadir a cada tubo 5µl de **5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix (tapa roja)**.
3. Vórtex + Spin a la tira de muestras.
4. Dividir las muestras en dos tiras de tubos nuevas con 5µl cada una.
5. Añadir 5µl de cada pool de **Oncomine™ TML Assay 2X Primer Pools (tapas azules)** a una tira diferente.
6. Vórtex + Spin a las tiras de muestras.
7. Colocar los adaptadores en la placa del Veriti (2 tubos de 0,2 ml en dos esquinas opuestas + 1 tubo de 0,2 ml en las otras dos esquinas opuestas).
8. Colocar las tiras de muestras en el centro y correr el siguiente programa (volumen final 10µl):

Stage	Step	Temperature	Time
Hold	Activate the enzyme	99°C	2 min
15 Cycles	Denature	99°C	15 sec
	Anneal and extend	60°C	16 min
Hold	—	10°C	Hold

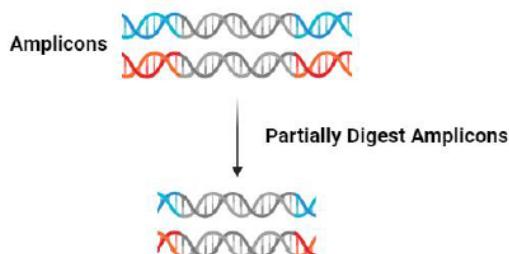
Tras la PCR, hacer spin a las muestras y estas se pueden almacenar overnight a 10°C o congelar a -20°C para períodos más largos. La muestra a partir de este punto es considerada **POST-PCR**.

3. DIGESTIÓN PARCIAL DE LOS AMPLICONES:

Nota: Vortexear bien la FuPa y centrifugar para recuperarlo en el fondo.

Cuidado al quitar el film de la placa de los barcodes, para que no se contaminen las muestras entre ellas.

Utilizar Veriti™ 96-well Thermal Cycler (Folder Alberto, Programa TML FuPa Digestion)



Esta etapa consiste en una digestión parcial con la **enzima FuPa (tapa marrón)** de los amplicones generados.

Protocolo:

1. Descongelar en hielo y vórtex + spin a la **enzima FuPa (tapa marrón)**.
2. Spin a las muestras.
3. Combinar ambas tiras de muestras en una única tira ($V_F = 10 + 10 = 20\mu\text{l}$). **IMPORTANTE:** El volumen de ambos pools debe ser igual y es crítico. Pipetear con cuidado.
4. Añadir $2\mu\text{l}$ de la enzima a cada una de las muestras.
5. Colocar la tira de muestras en el Veriti de la misma manera que en el paso anterior. Correr el siguiente programa:

Temperature	Time
50°C	20 minutes
55°C	20 minutes
60°C	20 minutes
10°C	Hold (for up to 1 hour)

6. Sacar la **Switch Solution (tapa amarilla)** para que se vaya descongelando en el hielo y **preparar los barcodes** sino están ya previamente listos.
No se puede almacenar overnight al terminar este paso ni hacer pausas, se debe continuar con la ligación de los barcodes lo antes posible.

4. LIGACIÓN DE LOS BARCODES:

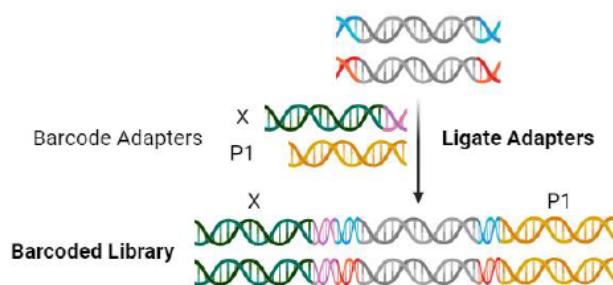
Nota: MUY IMPORTANTE. Cada librería, es decir, cada muestra, tiene que llevar un barcode diferente, porque posteriormente van a ser mezcladas diferentes muestras para el mismo chip.

Existen diferentes tipos de barcodes que se pueden utilizar (Ion Select, Ion Dual). Nosotros utilizamos los **Ion Dual 1-96** (NO vienen con el kit, Cat. No. A39360). En cualquier caso, es muy importante no mezclar los dos tipos en el mismo chip.

MUY IMPORTANTE. Añadir la **Ligasa** (tapa azul) en último lugar. No se puede hacer un mix con los componentes de la reacción. Echar en el orden indicado.

La **Switch Solution** puede precipitar, si es así, vórtex y centrifugar a temperatura ambiente.

Utilizar Veriti™ 96-well Thermal Cycler (Folder Alberto, Programa TML BARCODE LIGATION)



El adaptador P1 es el que se une a la Esfera (Ion Sphere Particle) y el X es donde se une el primer para secuenciar, la región azul correspondería al barcode. En la secuenciación el primer de secuenciación se une a X y la cadena complementaria se sintetiza hacia la esfera. La **Switch Solution** sirve para cambiar las condiciones de los buffers anteriores y que la **Ligasa** pueda funcionar.

La reacción consiste en una ligación de los adaptadores barcodados en los amplicones parcialmente digeridos. **CADA muestra debe tener un barcode diferente** ya que luego se mezclan y leen en el mismo chip. De cada muestra hay que apuntar con que barcode se ha ligado.

Protocolo:

1. Spin a las muestras al sacarlas del termociclador.
2. Vórtex + spin a la **Switch Solution (tapa amarilla)** (para disolver los posibles precipitados).
3. Añadir en cada tubo en orden:

Order of addition	Component	Volume
1	Switch Solution (yellow cap)	4 µL
2	Adapters (Ion Torrent™ Dual Barcode Adapters, IonCode™ Barcode Adapters, or diluted Ion Xpress™ barcode adapter mix (for barcoded libraries))	2 µL
3	DNA Ligase (blue cap)	2 µL
Total volume (including ~22 µL of digested amplicon)		~30 µL

- Coger la **Switch Solution** con una p20 (bastante viscosa).
 - Centrifugar en la centrífuga para placas la placa con los barcodes ya descongelados, y un contrapeso adecuado (hay uno en la caja de PRE).
 - Destapar los pocillos de la placa de los barcodes uno por uno, a medida que se van añadiendo a las muestras, para evitar contaminaciones cruzadas. Sellar la placa bien con cinta antes de guardas (AHORA SE PASAN A TUBOS DE 0,2ml).
 - Mezclar la **Ligasa** a toques y añadir en último lugar.
4. Vórtex + spin a las muestras.
5. Cargar las muestras en el Veriti y correr el siguiente programa:

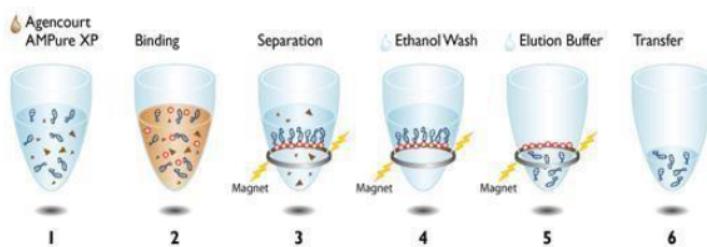
Temperature	Time
22°C	30 minutes
68°C	5 minutes
72°C	5 minutes
10°C	Hold (for up to 24 hours)

6. Sacar las beads de purificación y la alícuota de Low TE para que atemperen si se va a continuar con la purificación después. Sino las muestras pueden ser congeladas a -20°C para conservarlas hasta que se continue.

5. PURIFICACIÓN DE LAS LIBRERÍAS:

Nota: Preparar 350 µL de Etanol 70% por muestra. **Preparar en el momento.** Las beads tienen que estar a temperatura ambiente media hora antes.

MUY IMPORTANTE. El Etanol residual de los lavados de las beads interfiere con la amplificación posterior de las librerías. Si fuera necesario, centrifugar para eliminar mejor todo el etanol antes del secado. Aun así, tampoco secar en exceso las beads magnéticas.



1. PCR reaction 2. Binding of PCR amplicons to magnetic beads 3. Separation of PCR amplicons bound to magnetic beads from contaminants 4. Washing of PCR amplicons with Ethanol 5. Elution of PCR amplicons from the magnetic particles 6. Transfer away from the beads into a new plate

Para este punto se necesita Agencourt™ AMPure™ XP kit (Beckman Coulter, A63880 o A63881).

Protocolo:

1. Resuspender con vórtex el bote de beads hasta que no haya nada en el fondo y esté bien homogéneo.
2. Hacer una alícuota con un poco más de la cantidad necesaria para todas las muestras ($45\mu\text{l} \times n+1$ muestras).
3. Añadir $45\mu\text{l}$ del reactivo AMPure beads por muestra de librería. Vórtex a la alícuota después de cada muestra o cada par de muestras (las beads precipitan muy rápido).
4. **Binding.** Pipetear arriba y abajo unas 5 veces para mezclar las beads con el DNA de la librerías. Incubar 5 min a temperatura ambiente. **En este punto la librería se une a las beads.** Durante estos 5 min se puede preparar el etanol 70% a partir de etanol 100% y agua purificada tipo I.
5. **Separation.** Colocar las muestras en el rack magnético, unos 2 min o hasta que la solución se aclare. Eliminar el sobrenadante manteniendo el pellet intacto.
6. **Lavado con Etanol 1.** Añadir $150\mu\text{l}$ de etanol 70%. Mezclar y volver a colocar en el rack en la posición opuesta. Esperar 2 min. El pellet se desplaza de un lado a otro del tubo. Eliminar el sobrenadante manteniendo el pellet intacto.
7. **Lavado con Etanol 2.** Añadir $150\mu\text{l}$ de etanol 70%. Mezclar y volver a colocar en el rack en la posición opuesta. Esperar 2 min. Eliminar el sobrenadante manteniendo el pellet intacto. Eliminar primero con una punta de $200\mu\text{l}$ y luego con una de $10\mu\text{l}$. Eliminar todas las gotitas de la pared y el fondo. En este punto dejar que se seque lo suficiente, unos 4 min a temperatura ambiente. El punto de secado es en el que el pellet deje de brillar, **QUE NO LLEGUE A SECARSE EN EXCESO** o no hay forma de resuspenderlo correctamente.
8. **Elution.** Añadir $30\mu\text{l}$ de LOW TE al pellet seco de beads. Mezclar bien pipeteando, con insistencia y rascando las paredes del tubo con la punta. Incubar 2 min sin el rack (**para que el DNA se libere de las beads**). Incubar 2 min en el rack magnético.
9. **Transfer.** Pasar el sobrenadante que contiene las librerías eluidas en el buffer TE sin las beads a una nueva tira de tubos.

En este punto se puede congelar las librerías a -20°C , o conservar unos días a 4°C .

CUANTIFICACIÓN DE LAS LIBRERÍAS

Nota: Para la cuantificación de las librerías se necesita el kit Ion Library TaqMan® Quantitation Kit (Cat. No. 4468802). El protocolo del kit de cuantificación es ligeramente distinto al que viene indicado en el del protocolo de TML, utilizar el del TML.

Es importante cuantificar todas las muestras que van en el mismo chip a la vez (8 muestras para el 540). La reacción se puede hacer en el Lightcycler 480 o en el StepOne AB utilizando la mitad de volumen ($V_f = 10\mu L$). Realizar una recta patrón y guardar las diluciones aliquotadas.

Analizar cada muestra, estándar, NTC y negativos por duplicados técnicos.

Protocolo qPCR:

1. Iniciar el termociclador y seleccionar el programa correspondiente (Alberto AAA Final TCR Cuantificación Librerías).
2. Descongelar las muestras, el NTC, los estándares y los reactivos de la cuantificación en hielo. Vórtex y spin a las muestras.
3. Preparar una dilución 1:500 de las librerías (tomar $2\mu L$ de las librerías y añadir $498\mu L$ de agua tipo I).
4. **Preparación de la recta patrón estándar.** En el caso que sea necesario, realizar una dilución seriada 1:10 del estándar *E. coli* DH10B Ion Control Library. El patrón está a 68pM, generar 4 puntos más (6.8pM STD1 – 0.68pM STD2 – 0.068pM STD3 – 0.0068pM STD4). Congelar las alícuotas en tubos de 0.2ml a -20°C.
5. **Preparar el mix para la qPCR.** Todo va por **duplicado técnico** y un 5-10% se pierde en los pipeteos. La reacción se hace en un volumen final de $10\mu L$ ($5\mu L$ de Master Mix polimerasa, $0.5\mu L$ de la sonda Taqman y $4.5\mu L$ de la muestra o control). Estas cantidades son para la placa de 384 pocillos, pero por ahorrar reactivos para la placa de 96 pocillos también sirve.

Component	Volume per reaction	
	96-well plate	384-well plate
Ion Library qPCR Master Mix, 2X	10 μL	5 μL
Ion Library TaqMan™ Quantitation Assay, 20X	1 μL	0.5 μL
Total	11 μL	5.5 μL

6. **Calcular.** ($nº$ de muestras + 4 STDs + NTC + H_2O) * 2. Sobreestimar 4-8 muestras por errores de pipeteo.
7. **Preparar la reacción.** Añadir $5.5\mu L$ del mix de reacción a cada pocillo de una p96. Añadir $4.5\mu L$ del estándar, muestra, NTC o agua (control negativo). Al añadir las muestras, mezclar con la pipeta.

8. Sellar la placa con el plástico LightCycler 480 Sealing Foil (Roche) y sellador de placas (usamos el de Elvira). Retiramos el plástico blanco protector, pegar, sellar con el sellador de placas y retirar las tiras de los extremos.
9. Mezclar bien (vórtex a la placa sellada) y centrifugar en centrífuga de placas para acumular en el fondo del pocillo.

10. Iniciar el programa en el termociclador (Standard):

Reaction plate format	Run mode	Stage	Temperature	Time
48- / 96-well Fast	Fast	Hold (UDG incubation)	50°C	2 m
		Hold (polymerase activation)	95°C	20 s
		Cycle (40 cycles)	95°C	1 s
			60°C	20 s
96-well Standard	Standard	Hold (UDG incubation)	50°C	2 m
		Hold (polymerase activation)	95°C	2 m
		Cycle (40 cycles)	95°C	15 s
			60°C	1 m

- Ctrl + Alt + Delete → Username: Operator, Password: LC480
- Iniciar el programa LC480 → Username: Oncología, Password: Oncología1
- Esperar a que inicie el programa. Abrir el aparato (el botón está roto, presionar el botón de apertura fuerte y prolongadamente en la esquina superior izquierda con un boli). Poner la placa y cerrar el aparato con el mismo botón.
- New experiment from template → AAA Final TCR Library Quantification Run → ✓
- Start run
- Subset editor → + → Nombrar nuevo template → Seleccionar todos los pocillos donde hay carga → Apply
- Sample editor → Abs. Quant. Dentro del subset: Seleccionar el nuevo subset creado (no all samples).
- Nombrar estándares con sus concentraciones y replicados y quant. Sample type: Standard. Nombrar muestras con sus replicados como unknown, así como el NTC. Nombrar H2O como negative control.

11. Al terminar la qPCR:

- Analysis → Abs quant/ 2nd derivate max → Seleccionar el subset → ✓ → Calculate.
- Guardar datos de samples, replicate Statistics y parámetros de la curva en la carpeta TML experiments y en un pendrive para exportar los datos en archivo .txt.

12. Sacar la placa y apagar el ordenador y el aparato.

Utilizando la recta patrón y el factor de dilución (1/500) calcular la concentración de las muestras sin diluir. Diluir las librerías a 50 pM y mezclar hasta 8 juntas ($V_f = 27.2\mu\text{l} // 3.4\ \mu\text{l}$ por librería). En el Chef se usan unos $25\mu\text{l}$.

COMBINACIÓN DE LAS LIBRERÍAS (POOL)

En cada chip Ion 540 caben 8 muestras de TML.

Protocolo:

1. Utilizando la recta patrón y el factor de dilución (1:500), calcular la concentración de las muestras sin diluir. Multiplicar x500 el dato de concentración de la cuantificación.
2. Diluir las muestras a 50pM con agua tipo I o Low TE, preferentemente a partir de una dilución anterior (1:50). Se toman 5µl de esta dilución previa y se le añade agua para llevarla a 50pM:

$$Vol_{H2O} = \left(\frac{5 \times C_0 / 50}{50} \right) - 5$$

Si el resultado del volumen de agua a añadir sale negativo, preparar la dilución 50pM a partir de la librería concentrada en lugar de la dilución 1:50.