

Linfocitos infiltrantes de tumor en sangre periférica en un modelo de neuroblastoma

M.L. Espinoza Vega¹, A.L. Luis Huertas¹, A. González Murillo², L. Franco-Luzón², M. Ramírez Orellana³

¹Servicio de Cirugía Pediátrica. ²Fundación de Investigación Biomédica. ³Servicio de Oncohematología, Unidad de Terapias Avanzadas. Hospital Infantil Universitario Niño Jesús. Madrid.

RESUMEN

Objetivo. Comprobar la existencia de linfocitos T que incluyen linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) en la sangre periférica (SP) de un modelo preclínico de neuroblastoma.

Material y métodos. Utilizamos un modelo en ratones inmunodeficientes y otro en inmunocompetentes mediante inyección de suspensiones de la línea tumoral NB36769 con mutación de MYCN (TH-MYCN⁺). Se realizaron análisis por citometría de flujo (bazo, SP y tumor) y secuenciación del TCR- β en el ADN de muestras pareadas de tumor y SP.

Resultados. En los ratones inmunodeficientes el componente principal en SP fue CD4: 83,1% (control) y 86,1% (tumor), siendo PD-1⁺ el 0,4 y el 0,3%. En el bazo obtuvimos un mayor porcentaje de linfocitos T PD-1⁺ que en SP, siendo similar en el control (6,5%) y en el ratón con tumor (6,2%), en subpoblación CD4⁺ exclusivamente. En los ratones inmunocompetentes observamos que la proporción de los 10 clones más frecuentes en los tumores constituía el 11,09% \pm 2,83% del repertorio del TCR, mientras en SP representaba el 1,59% \pm 0,59% (p= 0,024). Estos resultados sugieren un enriquecimiento de clonotipos dentro del tumor. De los 10 clones más frecuentes en las muestras tumorales, localizamos 9 también en la SP en dos ratones y 6 en el tercero. Además, encontramos secuencias compartidas por TILs de animales diferentes.

Conclusiones. Nuestros resultados de inmunofenotipo y clonalidad apuntan a la existencia de linfocitos en SP que podrían contener TILs en un modelo experimental de neuroblastoma.

PALABRAS CLAVE: Neuroblastoma; Inmunoterapia; Linfocitos infiltrantes de tumor.

PERIPHERAL BLOOD TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES IN A NEUROBLASTOMA MODEL

ABSTRACT

Objective. To detect tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in the peripheral blood (PB) of a preclinical neuroblastoma model.

Materials and methods. Two types of preclinical models – immunodeficient mice and immunocompetent mice – were generated by injecting a cell suspension of neuroblastoma cell line NB36769 with MYCN gene

(TH-MYCN⁺) overexpression. Spleen, tumor, and peripheral blood were studied using flow cytometry to detect PD-1⁺ T-cells. TCR- β immunosequencing was performed in matched samples (tumor and peripheral blood).

Results. Most PB T-cells of immunodeficient mice were CD4 (control: 83.1%; tumor: 86.1%), with a small proportion of PD-1⁺ T-cells (control: 0.4%; tumor: 0.3%). However, the percentage of PD-1⁺ T-cells in the spleen was higher (control: 6.5%; tumor: 6.2%), and it was expressed in the CD4⁺ subset only.

Regarding the TCR repertoire of immunocompetent mice, the proportion of the 10 most frequent sequences was significantly higher in tumors (11.09% \pm 2.83%) than in the peripheral blood (1.59% \pm 0.59%) (p=0.024). These findings are suggestive of clonotype enrichment within the tumor. 9 out of the 10 most frequent tumor clones were identified in the matched peripheral blood sample in 2 mice, and 6 out of 10 in one mouse. In addition, TILs with shared sequences from different animals were found.

Conclusions. Our results in terms of immunophenotype and clonality suggest the presence of PB T-cells which could include TILs in a preclinical neuroblastoma model.

KEY WORDS: Neuroblastoma; Immunotherapy; Tumor-Infiltrating lymphocytes.

INTRODUCCIÓN

El neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más frecuente en la edad pediátrica, con una incidencia anual de 1,1 cada 100.000 niños de entre 0 y 14 años, constituyendo hasta el 7% de todos los tumores malignos en menores de 15 años⁽¹⁾. A pesar de los avances en el tratamiento de esta patología durante los últimos años, las tasas generales de supervivencia en los pacientes con tumores de alto riesgo son menores del 40%, incluso con la utilización de terapia intensiva multimodal^(2,3). En la actualidad, el neuroblastoma supone hasta el 15% de todas las muertes por cáncer en la edad pediátrica⁽⁴⁾.

La aparición de estrategias de inmunoterapia como la terapia celular adoptiva (TCA) para el tratamiento de tumores sólidos se presenta como una nueva opción terapéutica para mejorar los resultados de esta población. Aunque existen numerosos ensayos clínicos en tumores típicos de adultos como el melanoma, son pocas las vías que han explorado su potencial terapéutico en tumores infantiles⁽⁵⁾.

Correspondencia: Dr. Manuel Ramírez. Servicio de Cirugía Pediátrica. Hospital Infantil Universitario Niño Jesús. Av. de Menéndez Pelayo, 65. 28009 Madrid. E-mail: Manuel.l.espinosa.vega@gmail.com

Recibido: Diciembre 2019

Aceptado: Febrero 2020

Los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) constituyen una población heterogénea de células T $\alpha\beta$. La presencia de infiltrado de estas células linfoides en los tumores se ha asociado a un pronóstico más favorable en pacientes con neuroblastoma⁽⁶⁾. El grupo del Dr. Rosenberg ha demostrado que las células T PD1⁺ de la sangre periférica (SP) de pacientes con melanoma contienen linfocitos T antitumorales, sugiriendo que se trata de una subpoblación circulante de TILs⁽⁷⁻⁹⁾, con un inmunofenotipo que se caracteriza por ser CD3⁺, con subpoblaciones de CD4⁺ y CD8⁺ que expresan además PD-1, por lo que pueden ser reconocidas mediante citometría de flujo.

En el caso del neuroblastoma, un tumor retroperitoneal de difícil acceso, la obtención de muestras tisulares requiere de procedimientos invasivos. La posibilidad de que estas células circulen en SP podría evitar estas intervenciones y disminuir la morbilidad a la que están sometidos estos pacientes.

En este trabajo desarrollamos un modelo murino con la finalidad de comprobar la existencia de linfocitos PD-1⁺ circulantes en la SP que podrían servir como fuente de dichas células para su utilización en el desarrollo de TCA.

MATERIAL Y MÉTODOS

- **Animales:** se utilizaron ratones (*Mus musculus*) inmunodeficientes *NOD scid gamma*, que carecen de linfocitos B y T, y *wild type* (WT) de la sublínea 129/SvJ para el modelo inmunocompetente. Dichos animales se compraron al repositorio del *National Cancer Institute* (Frederick, Maryland, EE.UU.). Su cría y mantenimiento se llevó a cabo en el Servicio del Animalario del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) con registro 28079-21 A. Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el OEBA (órgano para evaluar el bienestar animal), en CIEMAT y el Departamento Regional de Madrid de Medio Ambiente, con referencia PROEX 186/15.
- **Células:** se seleccionó la línea celular de neuroblastoma 36769 (NB36769) con una amplificación del oncogen MYCN por el promotor de la tirosina hidroxilasa de rata (TH-MYCN⁺) proveniente de ratones 129/SvJ⁽¹⁰⁾. Dicha línea fue cedida por el profesor Louis Chesler (*The Royal Marsden Hospital*, Londres). Las células tumorales, también denominadas neuroesferas, se cultivaron en suspensión con medio DMEM:F12 (1:1) (Gibco™), suplementado con 1 × B27 sin vitamina A (Gibco™), mFGF 40 ng/ml (R&D Systems®), mEGF 20 ng/ml (R&D Systems®) y penicilina-estreptomicina 1% (Gibco®) en estufa a 37°C y 5% CO₂ y se mantuvieron a niveles de subconfluencia con renovación del medio cada 3-4 días.
- **Modelo de neuroblastoma en animales inmunodeficientes:** se inyectaron suspensiones de 1 × 10⁶ neuroesferas en 50 µl de medio no suplementado en el tejido celular subcutáneo de la región dorsal derecha utilizando agujas

de 25 G × 5/8". Al octavo día postinyección, se inocularon en la misma región suspensiones con 1 × 10⁵ TILs obtenidos de neuroblastomas generados mediante el modelo de trasplante ortotópico en ratones 129/SvJ inmunocompetentes con la misma línea (NB36769).

- **Modelo de neuroblastoma en animal inmunocompetente:** se implantaron suspensiones de 4 × 10⁵ neuroesferas en 30 µl de medio no suplementado mediante inyección ortotópica en la glándula suprarrenal izquierda según describió nuestro grupo⁽¹¹⁾.

El sacrificio se realizó a las 4 semanas del implante. Se obtuvieron muestras de SP por exanguinación y tumorales mediante exéresis.

Las muestras de SP se conservaron con 50 µl de EDTA 0,5 M, a temperatura ambiente. Se utilizó solución lisante de hematíes (Quiclysis™, Cytognos) a temperatura ambiente, en oscuridad, durante 10 minutos. Las células fueron lavadas con PBS pH 7,2 (Gibco™) dos veces.

Los bazos fueron procesados mediante disgregación mecánica sobre un filtro de 40 µm en tubos cónicos con 30 ml de PBS para la suspensión celular.

Los tumores fueron procesados mediante disgregación mecánica y digestión enzimática con medio RPMI-1640 (Gibco™) suplementado con colagenasa D 1 mg/ml (Roche) y DNAasa 2500 U (Pulmozyme®, Roche), a 37°C, durante 45 minutos. La digestión enzimática fue inactivada con FBS y las suspensiones celulares filtradas a través de un filtro de 40 µm. El pellet resultante se lavó dos veces y se resuspendió en 30 ml de PBS.

Se congelaron alícuotas de suspensiones celulares en seco para el aislamiento de ADN y el resto se resuspendió en PBS para su estudio por citometría de flujo (FACSCanto™ II, Becton Dickinson).

- **Citometría de flujo:** se incubaron 1 × 10⁵ células de las muestras procesadas con los anticuerpos monoclonales CD45.2, CD3, CD4, CD8, PD1 y 7-AAD (Biolegend®) en 100 µl de PBS, durante 20 minutos a 4°C, en oscuridad.
- **Clonalidad:** se purificó el ADN de suspensiones unicelulares congeladas de tumor de 6 ratones 129/SvJ trasplantados y de muestras pareadas de SP de 3 de ellos con el kit QIAamp DNeasy para sangre y tejidos (Qiagen N.V.)⁽¹²⁾. La inmunosecuenciación de la región TCR-β se realizó por Adaptive Biotechnologies Corp. (Seattle, WA, USA) en el ADN purificado y los datos fueron analizados utilizando el analizador immunoSEQ®. Los resultados se expresaron como el porcentaje del total de patrones de células T originadas por las 10 secuencias más frecuentes⁽¹³⁾.

RESULTADOS

Modelo murino inmunodeficiente

Los ratones *NOD scid gamma* carecen de linfocitos T, por lo que son un modelo en el que estudiar el comportamiento

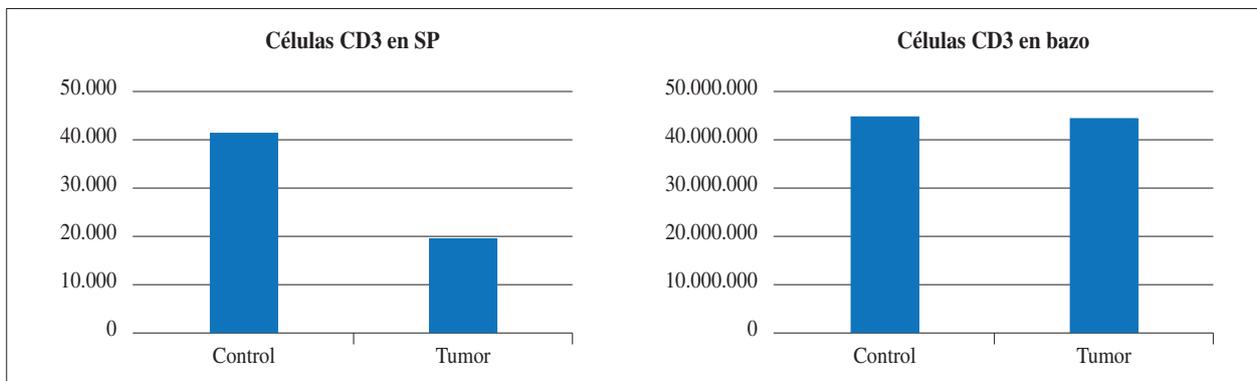


Figura 1. Componente linfocitario en la SP y el bazo de los ratones inmunodeficientes tras la inyección de TILs (número total de células/ml).

de linfocitos T exógenos. En nuestro caso, la única fuente de linfocitos T fueron TILs previamente obtenidos de neuroblastomas desarrollados en ratones inmunocompetentes (véase *Metodología*). El ratón control presentó un mayor número total de linfocitos T en SP que el ratón con tumor (41.175 células/ml, 2,7% y 20.000 células/ml, 3,2%, respectivamente). Al analizar el infiltrado linfocitario del bazo, observamos que el porcentaje de linfocitos T fue similar en ambos ratones (control: 44.804.375 células/ml, 20,9% y tumor: 44.446.500 células/ml, 20,4%) (Fig. 1).

El componente principal de las subpoblaciones de linfocitos T en SP estaba formado por CD4: 83,1% para el ratón control y 86,1% para el ratón con tumor, siendo PD-1⁺ el 0,4 y el 0,3%, respectivamente. No se identificaron linfocitos CD8⁺ en el control y en el ratón con tumor el porcentaje fue mínimo (0,1%), sin observar linfocitos CD8⁺PD-1⁺. En el bazo obtuvimos un mayor porcentaje de linfocitos T PD-1⁺ que en SP. Este porcentaje fue similar en el ratón control (6,5%) que en el ratón con tumor (6,2%). En ambos la subpoblación T PD-1⁺ estaba compuesta por CD4⁺, sin identificarse linfocitos CD8⁺PD1⁺ (Fig. 2).

Modelo murino inmunocompetente

En primer lugar, comprobamos por citometría de flujo en el modelo inmunocompetente una distribución similar de linfocitos T en SP con predominio de linfocitos CD4⁺PD1⁺. Además, evaluamos el repertorio del TCR de TILs y SP para comprobar la existencia de linfocitos T clonales en ambas localizaciones anatómicas. Analizamos 6 ratones con neuroblastomas mediante secuenciación masiva de la región CDR3 del TCR-β. En tres de ellos solo se analizaron los tumores.

Cuando analizamos los niveles de linfocitos T en SP mediante CD3 obtuvimos $1.175.667 \pm 773.224$ células/ml ($32,23 \pm 7,48\%$), mientras que los niveles de linfocitos T en el tumor fueron de 261.500 ± 71.409 células/ml ($0,1 \pm 1,7E-17\%$) (Fig. 3).

Inicialmente, analizamos los 10 clones más frecuentes en las muestras pareadas (tumor-SP) de 3 ratones, observando que en los tumores esta proporción constituía el $11,09\% \pm 2,83\%$

Tabla I. Secuencias compartidas por las muestras tumorales.

Aminoácidos	Suma (frecuencia productiva)	Presente en
CASSQDRGSYEQYF	0,614106	3
CASSPGQGAGEQYF	3	3
CASSQNQAPLF	0,195684	2
CASSQGSSYEQYF	0,834896	2
CASSQDWGDEQYF	0,356441	2
CASSPRTGDYAEQFF	1	2
CASGDLGGS AETLYF	2	2

Secuencias compartidas por las muestras tumorales que podrían constituir clonotipos específicos de TILs contra el neuroblastoma.

del repertorio del TCR, mientras que en SP representaba el $1,59\% \pm 0,59\%$ ($p= 0,024$). Estos resultados sugieren un enriquecimiento de clonotipos dentro del tumor (Fig. 4).

Cuando investigamos la distribución clonal de las células T en los tumores de los 6 ratones, no encontramos secuencias comunes para todos. Sin embargo, existen dos secuencias compartidas por tres de los ratones y cinco por dos, representando el 7,64% del repertorio de TCR en todas las muestras. Estas secuencias podrían corresponder con clones específicos de tumor contra neuroblastoma (Tabla I).

Por último, el análisis de las muestras pareadas mostró un promedio de 132 ± 79 secuencias compartidas de un total de 242 ± 68 secuencias en los tumores y 60.306 ± 25.765 secuencias en la SP. De los 10 clones más frecuentes encontrados en las muestras tumorales, 9 se encontraron también en la SP en dos de los ratones y 6 en el tercer ratón (Fig. 5).

DISCUSIÓN

Actualmente, los TILs han demostrado ser una herramienta terapéutica útil en el tratamiento de tumores como

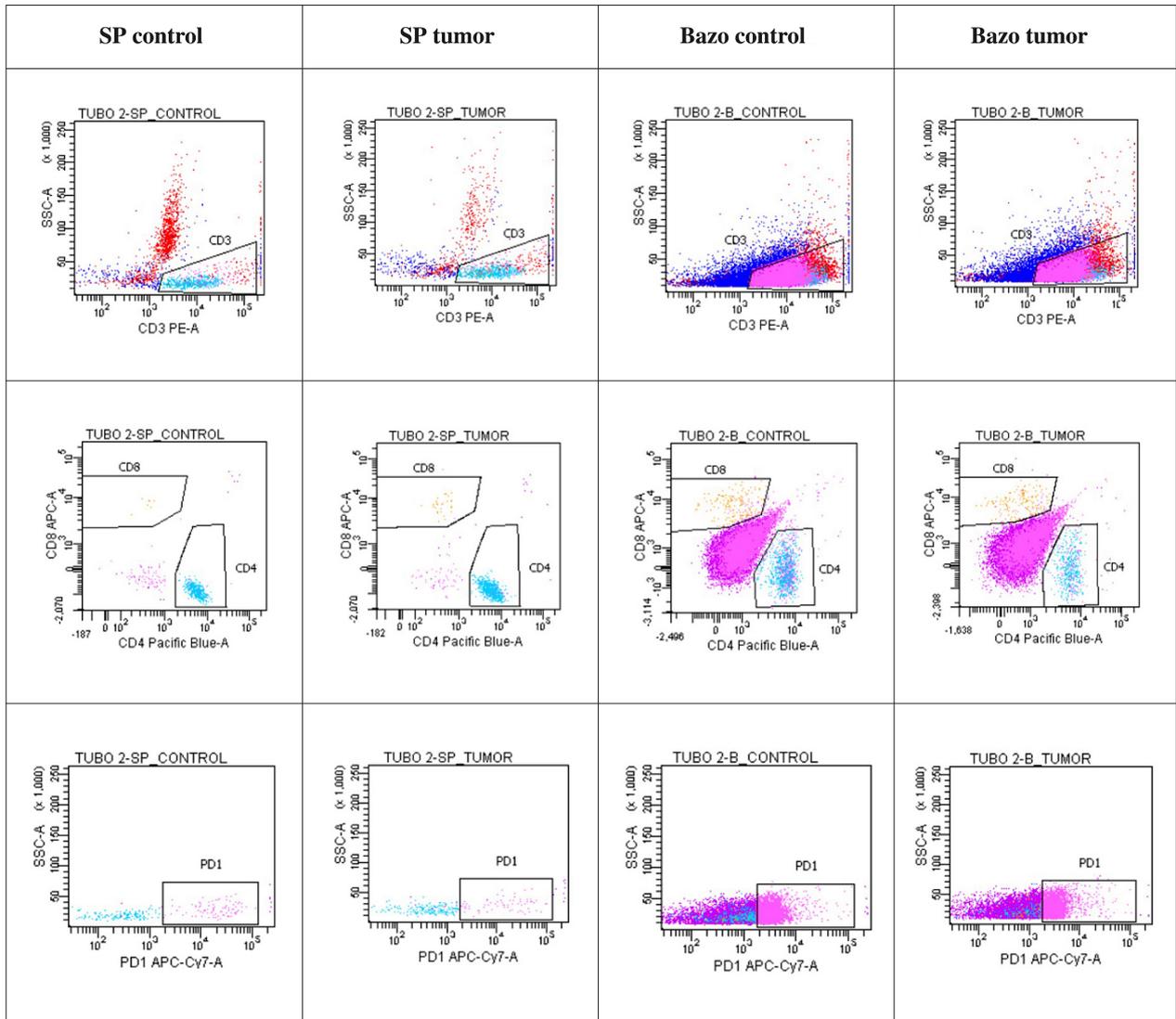


Figura 2. Subpoblaciones linfocitarias T por citometría de flujo en la SP y el bazo de los ratones inmunodeficientes tras la inyección de TILs.

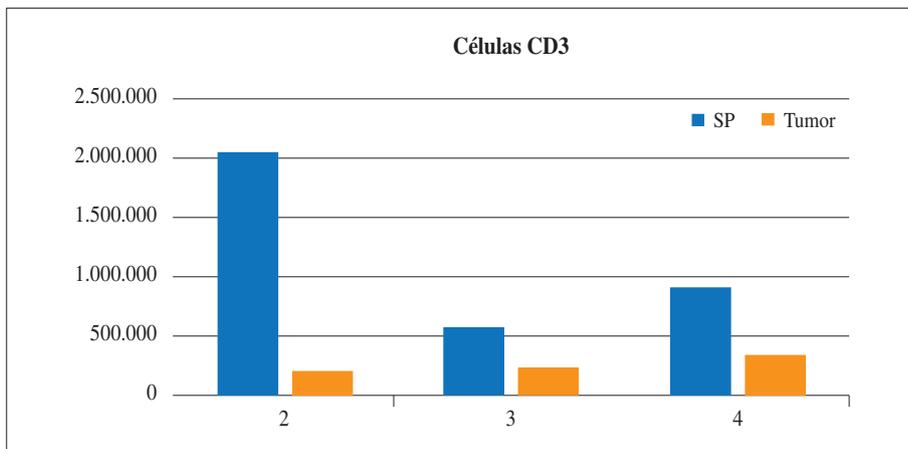


Figura 3. Niveles de linfocitos T intratumorales y en SP en los ratones inmunocompetentes.

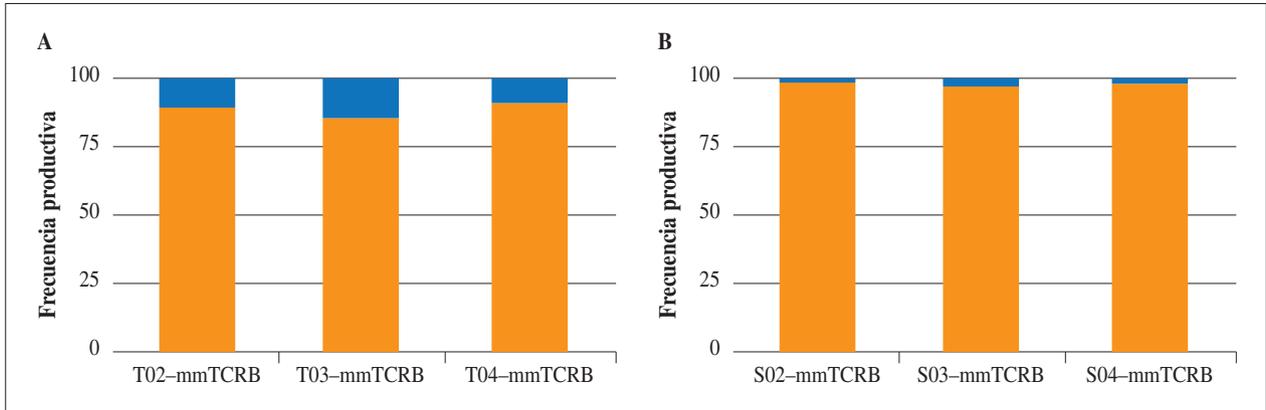


Figura 4. Distribución de los 10 clones más frecuentes de linfocitos T (en azul) en los tumores y la SP mediante secuenciación del TCR-β. A) Tumores ratón 02, ratón 03 y ratón 04. B) SP ratón 02, ratón 03 y ratón 04.

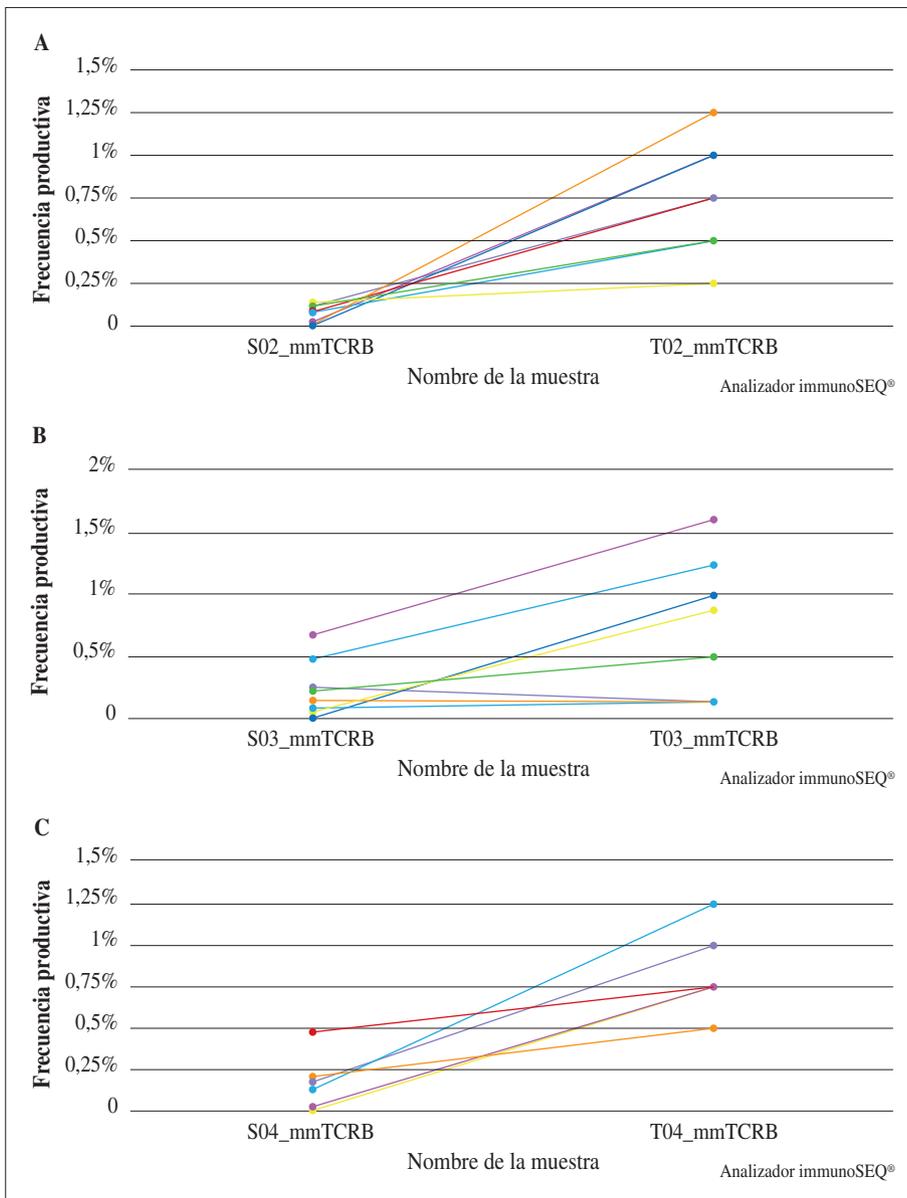


Figura 5. Relación gráfica de las secuencias de TCR compartidas entre la SP y el tumor. A) Ratón 02. B) Ratón 03. C) Ratón 04.

el melanoma⁽¹⁴⁾, donde un estudio reciente ha demostrado la posibilidad de reconocer una respuesta inmune antitumoral específica de cada paciente mediante la identificación de células T PD1⁺ en SP⁽⁷⁾. Por el contrario, en el caso de los tumores infantiles, la caracterización fenotípica y funcional de estas poblaciones inmunes está escasamente descrita en la literatura y la existencia de TILs PD1⁺ circulantes en SP no ha sido analizada previamente en el neuroblastoma^(7,15-19). La existencia de TILs circulantes en la SP de estos pacientes abriría la posibilidad de evitar procedimientos quirúrgicos para obtener el material de inicio para la fabricación de TCA^(7,15-20).

En este trabajo hemos estudiado la posibilidad de que individuos con neuroblastoma presenten TILs circulantes en SP. Para ello, hemos simulado la situación en un modelo murino. Para identificar estas células, hemos utilizado un criterio inmunofenotípico como es la expresión de PD-1 en linfocitos T circulantes. El grupo del Dr. Rosenberg demostró que en el melanoma las células T PD-1⁺ en SP contienen linfocitos T antitumorales, sugiriendo que se trata de una subpoblación circulante de TILs⁽⁷⁻⁹⁾. En un primer experimento, comprobamos la existencia de circulación de estas células en ratones inmunodeficientes, siendo el componente en SP CD4⁺PD1⁺, sin que se observaran prácticamente linfocitos CD8⁺PD1⁺. Posteriormente, confirmamos la existencia de estas células en ratones inmunocompetentes portadores de neuroblastoma generado mediante la inyección de la línea celular NB36769, comprobando por citometría de flujo una distribución similar en SP con el predominio de linfocitos CD4⁺PD1⁺. Este es el primer trabajo que analiza la existencia de estas células en SP de un modelo experimental de neuroblastoma. En los escasos ejemplos existentes en la literatura, destaca el trabajo llevado a cabo por Waki K y cols. en cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), que mostró también un componente mayoritario en SP de linfocitos T CD4⁺PD1⁺ con un fenotipo efector-memoria (CD45RA⁺CCR7⁺). Por otra parte, estudios realizados en melanoma han confirmado la existencia de un infiltrado mayoritario de TILs CD8⁺PD1⁺ en los tumores, siendo minoritarios en SP^(17,21). Estos datos se correlacionan con los resultados obtenidos en nuestros experimentos en los que la subpoblación CD4⁺PD1⁺ siempre excedió a la de CD8⁺PD1⁺, tanto en modelo inmunodeficiente con tumor implantado (la única fuente posible de linfocitos T circulantes fueron los TILs) como en el modelo inmunocompetente portador de neuroblastoma.

El otro criterio que hemos utilizado para identificar la presencia de TILs circulantes es la similitud de secuencias génicas (y de aminoácidos) en la región 3 hipervariable determinante de la complementariedad (CDR3) del TCR- β ^(13,22-29) mediante técnicas de secuenciación de nueva generación (SNG)^(22,24) que posibilitan detectar y rastrear células T específicas⁽²⁵⁾. En el caso del neuroblastoma, no existen muchas publicaciones que hayan analizado el repertorio del TCR de los TILs. En un estudio en el que se analizó la región CDR3 de los TILs de 6 pacientes con neuroblastomas, la mitad de ellos presentó una marcada expansión clonal de linfocitos T no observada en la sangre, aunque este trabajo se realizó con

técnicas de secuenciación antiguas⁽²⁸⁾. Nosotros hemos encontrado también una situación de oligoclonalidad en los TILs respecto a la SP. En el análisis de los 10 clones más frecuentes de los tumores encontramos un enriquecimiento de clonotipos. Por otra parte, acorde a la literatura, no hemos encontrado secuencias compartidas por todos los tumores analizados. Sin embargo, existen dos secuencias compartidas por tres de los tumores y cinco por dos. La existencia de secuencias clonoespecíficas similares en los linfocitos T de diferentes animales que comparten los antígenos del MHC sugiere que dichas subpoblaciones de linfocitos T se han expandido frente a un antígeno que comparten los diferentes individuos y es presentado por las moléculas del MHC. Por tanto, podrían corresponder con clones específicos de tumor contra el neuroblastoma. La relevancia de nuestros resultados en relación a estos hallazgos consiste en la demostración *in vivo* de la posible existencia de una respuesta frente a antígenos comunes expresados por el neuroblastoma y que podrían ser de utilidad para el rastreo de las células T responsables de esta respuesta, además de para su reconocimiento y utilización como TCA. El análisis del repertorio de TCR intratumoral de pacientes con neuroblastoma mediante técnicas de SNG podría permitir un mejor entendimiento de la diversidad del infiltrado tumoral por TILs, su grado de reactividad y su antígeno-especificidad.

El grupo del Dr. Rosenberg ha demostrado recientemente la posibilidad de identificar una respuesta inmune antitumoral específica de cada paciente mediante la identificación de células T PD1⁺ en SP⁽⁷⁾. Nuestros resultados por citometría de flujo corroboran la presencia de subpoblaciones que pueden contener linfocitos T antitumorales (PD1⁺) en la SP de los ratones portadores de neuroblastoma. Además, mediante la inmunosecuenciación del infiltrado tumoral, de manera similar al trabajo realizado por Gros y cols., hemos podido comprobar la existencia de clonotipos compartidos entre las muestras pareadas de tumor y SP, lo que refuerza la hipótesis de la circulación por el organismo de las células T implicadas en la respuesta inmune antitumoral también en el caso del neuroblastoma.

Existen en nuestro trabajo una serie de limitaciones. En primer lugar, aunque los modelos murinos de cáncer se han utilizado durante décadas para el estudio de la respuesta inmune antitumoral y el desarrollo de estrategias de inmunoterapia en experimentos preclínicos, los datos disponibles respecto al repertorio de TCR son escasos, lo que dificulta su comparación⁽²⁵⁾. En relación a la caracterización inmunofenotípica, no hemos analizado la expresión de CD39 o CD103, marcadores que en co-expresión identifican TILs CD8 con capacidad antitumoral en diferentes tumores humanos⁽³⁰⁾. Por último, se ha realizado un limitado número de casos experimentales debido al importante coste de los análisis realizados, lo que se refleja en la disminución de la potencia estadística para demostrar resultados. Sin embargo, la observación de las tendencias en nuestros experimentos nos alienta a continuar con esta línea de investigación, dados los beneficios potenciales que podrían significar para los pacientes pediátricos con neuroblastoma u otros tumores sólidos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68: 7-30.
2. Matthay K, Villablanca J, Seeger R. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. *Children's Cancer Group.* *N Engl J Med.* 1999; 341: 1165-73.
3. Matthay KK, Reynolds CP, Seeger RC, Shimada H, Adkins ES, Haas-kogan D, et al. Long-Term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a Children's Oncology Group Study. 2009; 27: 1007-13.
4. National Cancer Institute. Surveillance, epidemiology and end results database.
5. Tesfaye M, Savoldo B. Adoptive cell therapy in treating pediatric solid tumors. *Curr Oncol Rep.* 2018; 20: 73.
6. Gambini C, Conte M, Bernini G, Angelini P, Pession A, Paolucci P, et al. Neuroblastic tumors associated with opsoclonus-myoclonus syndrome: histological, immunohistochemical and molecular features of 15 Italian cases. *Virchows Arch.* 2003; 442: 555-62.
7. Gros A, Parkhurst MR, Tran E, Pasetto A, Robbins PF, Ilyas S, et al. Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients. *Nat Med.* 2016; 22: 433-8.
8. Schumacher TN, Scheper W. A liquid biopsy for cancer immunotherapy. *Nat Med.* 2016; 22: 340-1.
9. Hutchinson L. Immunotherapy: Antitumor T cells as peripheral biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016; 13: 203.
10. Teitz T, Stanke JJ, Federico S, Bradley CL, Brennan R, Zhang J, et al. Preclinical models for neuroblastoma: establishing a baseline for treatment. *PLoS One.* 2011; 6: e19133.
11. Luis AL, Espinoza M, Franco L, González-Murillo A, Melen GJ, Ollero Fresno JC, et al. Establecimiento de un modelo preclínico de neuroblastoma en ratones inmunocompetentes. *Cir Pediatr.* 2016; 29: 66-71.
12. Qiagen. DNeasy® Blood & Tissue Handbook for purification of total DNA from animal blood animal tissue. *DNeasy Blood & Tissue Handbook.* 2006. p. 1-59. Disponible en: <http://www.bea.ki.se/documents/EN-DNeasy%20handbook.pdf>
13. Kirsch I, Vignali M, Robins H. T-cell receptor profiling in cancer. *Mol Oncol.* 2015; 9: 2063-70.
14. Feldman SA, Assadipour Y, Kriley I, Goff SL, Rosenberg SA. Adoptive cell therapy—Tumor-infiltrating lymphocytes, T-cell receptors, and chimeric antigen receptors. *Semin Oncol.* 2015; 42: 626-39.
15. Malaspina TS de S, Gasparoto TH, Costa MRSN, de Melo Jr EF, Ikoma MRV, Damante JH, et al. Enhanced programmed death 1 (PD-1) and PD-1 ligand (PD-L1) expression in patients with actinic cheilitis and oral squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2011; 60: 965-74.
16. Baruah P, Lee M, Odutoye T, Williamson P, Hyde N, Kaski JC, et al. Decreased levels of alternative co-stimulatory receptors OX40 and 4-1BB characterise T cells from head and neck cancer patients. *Immunobiology.* 2012; 217: 669-75.
17. Krönig H, Julia Falchner K, Odendahl M, Brackertz B, Conrad H, Muck D, et al. PD-1 expression on melan-A-reactive T cells increases during progression to metastatic disease. *Int J Cancer.* 2012; 130: 2327-36.
18. Waki K, Yamada T, Yoshiyama K, Terazaki Y, Sakamoto S, Matsueda S, et al. PD-1 expression on peripheral blood T-cell subsets correlates with prognosis in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2014; 105: 1229-35.
19. Zheng H, Liu X, Zhang J, Rice SJ, Wagman M, Kong Y, et al. Expression of PD-1 on CD4+ T cells in peripheral blood associates with poor clinical outcome in non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2016; 7: 56233-40.
20. Choi BK, Kim S, Kim YH, Kwon BS. Cancer immunotherapy using tumor antigen-reactive T cells. *Immunotherapy.* 2018; 10: 235-45.
21. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood.* 2009; 114: 1537-44.
22. Robins H. Immunosequencing: applications of immune repertoire deep sequencing. *Curr Opin Immunol.* 2013; 25: 646-52.
23. Sensi M, Parmiani G. Analysis of TCR usage in human tumors: a new tool for assessing tumor-specific immune responses. *Immunol Today.* 1995; 16: 588-95.
24. Linnemann C, Mezzadra R, Schumacher TNM. TCR repertoires of intratumoral T-cell subsets. *Immunol Rev.* 2014; 257: 72-82.
25. Thor Straten P, Schrama D, Andersen MH, Becker JC. T-cell clonotypes in cancer. *J Transl Med.* 2004; 2: 11.
26. Schrama D, Ritter C, Becker JC. T cell receptor repertoire usage in cancer as a surrogate marker for immune responses. *Semin Immunopathol.* 2017; 39: 255-68.
27. Kuehm LM, Wolf K, Zahour J, DiPaolo RJ, Teague RM. Checkpoint blockade immunotherapy enhances the frequency and effector function of murine tumor-infiltrating T cells but does not alter TCRβ diversity. *Cancer Immunol Immunother.* 2019; 68: 1095-106.
28. Valteau D, Scott V, Carcelain G, Hartmann O, Escudier B, Hercend T, et al. T-cell receptor repertoire in neuroblastoma patients. *Cancer Res.* 1996; 56: 362-9.
29. Levraud JP, Pannetier C, Langlade-Demoyen P, Brichard V, Kourilsky P. Recurrent T cell receptor rearrangements in the cytotoxic T lymphocyte response in vivo against the p815 murine tumor. *J Exp Med.* 1996; 183: 439-49.
30. Duhon T, Duhon R, Montler R, Moses J, Moudgil T, de Miranda NF, et al. Co-expression of CD39 and CD103 identifies tumor-reactive CD8 T cells in human solid tumors. *Nat Commun.* 2018; 9: 2724.