



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología

Universitat Autònoma de Barcelona



Universitat Autònoma
de Barcelona

Tesis doctoral

**Caracterización de los linfocitos
infiltrantes de tumor desde la perspectiva
del TCR y la presentación antigénica en el
cáncer de mama**

Andrea Aran Garriga

Bellaterra, 2022

Memoria presentada por

Andrea Aran Garriga

Para optar al grado de

DOCTORA EN INMUNOLOGÍA

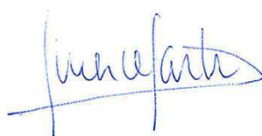
Tesis realizada en el laboratorio de Inmunología Celular del Instituto de Biotecnología y Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona bajo la dirección de la Dra. Mercè Martí Ripoll.

La doctoranda



Andrea Aran Garriga

La co-directora



Mercè Martí Ripoll

El co-director



Javier Cortés Castán

*“The more comfortable we become with being stupid,
the deeper we will wade into the unknown.”*

–Martin A. Schwartz, The importance of stupidity in scientific research

Índice

ABREVIACIONES	IX
RESUMEN.....	13
INTRODUCCIÓN	15
I. CÁNCER DE MAMA	17
I.1. Tipos de cáncer de mama y etiología	17
I.2. Tratamiento.....	19
I.2.1. Introducción a la inmunoterapia	19
I.2.2. Inmunoterapia en cáncer de mama.....	21
II. LA RESPUESTA INMUNITARIA ADAPTATIVA CELULAR	22
II.1. Linfocitos T	22
II.1.1. Ontogenia de los linfocitos T.....	22
II.1.2. Activación y función.....	23
II.1.3. Receptores de linfocitos T.....	25
II.2. Células presentadoras de antígeno	29
II.2.1. Células dendríticas.....	29
II.2.2. Linfocitos B.....	31
II.3. El sistema MHC.....	32
II.3.1. Características del sistema HLA	32
II.3.2. Estructura de las moléculas HLA-I y HLA-II.....	33
II.3.3. Biosíntesis de las moléculas del HLA y presentación antigénica	34
III. INMUNOLOGÍA DEL CÁNCER.....	36
III.1. El microambiente tumoral.....	37
III.1.1. Linfocitos y otras células infiltrantes de tumor.....	38
III.1.2. Linfocitos infiltrantes de tumor en cáncer de mama	38
III.2. Respuesta frente a antígenos tumorales.....	40
III.2.1. Antígenos asociados a tumor.....	40
III.2.2. Antígenos específicos de tumor	41
III.3. Inmunoedición del cáncer	42
III.3.1. Mecanismos de escape.....	42
III.4. El repertorio de TCR en cáncer.....	44
III.4.1. Factores determinantes del repertorio de TCR	46
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
HIPÓTESIS.....	49
OBJETIVOS.....	50
MATERIAL Y MÉTODOS	51
M1. MUESTRAS.....	53
M1.1. Biopsias de cáncer de mama.....	53
M1.2. Linfocitos T control.....	55
M1.3. Muestras de células dendríticas derivadas de monocitos.....	56
M1.4. Muestras del estudio de los B-TIL EBV+ del XAL generado en un PDX.....	56
M2. CULTIVOS CELULARES	57
M2.1. Purificación de células mononucleares de sangre periférica.....	57
M2.2. Linfocitos T	57

M2.2.1. Obtención y cultivos iniciales de los linfocitos T infiltrantes de tumor	57
M2.2.2. Linfocitos T de sangre periférica de donantes sanos	58
M2.2.3. Expansiones de linfocitos T.....	58
M2.3. Células dendríticas derivadas de monocitos.....	58
M2.4. Línea celular XAL-LCL.....	59
M2.4.1. Generación de la línea XAL-LCL.....	59
M2.4.2. Co-cultivos de T-TIL con células de la línea XAL-LCL.....	59
M3. CITOMETRÍA DE FLUJO.....	60
M3.1. Tinciones de marcadores de membrana	60
M3.2. Inmunoensayos <i>bead-based</i> de detección de moléculas solubles	61
M4. EXTRACCIONES DE ÁCIDOS NUCLEICOS	61
M4.1. Extracciones de ADN	61
M4.2. Extracciones de ARN.....	62
M5. SECUENCIACIÓN DE LOS TCR Y BCR.....	62
M5.1. Repertorio de TCR en los cultivos de T-TIL	62
M5.2. Repertorio de TCR y BCR en tejidos.....	62
M6. ELUCIÓN DE PÉPTIDOS PRESENTADOS POR LAS MOLÉCULAS DE HLA-ABC Y -DR	62
M6.1. Acoplamiento de los anticuerpos a las bolas de sefarosa.....	62
M6.2. Lisis celular y recolección de las membranas celulares.....	63
M6.3. Inmunoprecipitaciones.....	63
M6.4. Análisis de la espectrometría de masas	64
M7. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	64
M7.1. Análisis del repertorio de TCR.....	64
M7.1.1. Alineamiento de las librerías	64
M7.1.2. Análisis de las características del repertorio de TCR	64
M7.1.3. Análisis de TCR públicos en la bibliografía.....	66
M7.1.4. Análisis de motivos en CDR3.....	66
M7.2. Análisis del repertorio de BCR.....	66
M7.3. Análisis de los péptidos derivados de HLA-ABC y HLA-DR.....	67
M7.3.1. Identificación de proteínas de interés en el repertorio del XAL-LCL	67
M8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	68

CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE LOS LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMOR.....69

1.1. ANTECEDENTES	71
1.2. RESULTADOS	73
1.2.1. Las subpoblaciones de T-TIL CD4+ y CD8+ no están relacionadas con el número de T-TIL CD3+ infiltrantes.....	73
1.2.2. El porcentaje de T-TIL CD4+ en los cultivos iniciales está relacionado de forma inversa con la cantidad de moléculas secretadas con funciones citotóxicas.....	76
1.2.3. Caracterización del repertorio de TCR de los T-TIL en los cultivos iniciales	78
1.2.4. Los porcentajes de T-TIL CD4+ en los cultivos iniciales están relacionados de forma inversa con la diversidad del repertorio de TCR	83
1.4. DISCUSIÓN.....	88
1.3. FIGURAS SUPLEMENTARIAS	91

CAPÍTULO II. ESTUDIO DE LAS DIFERENCIAS EN EL REPERTORIO DE TCR DE LAS SUBPOBLACIONES CD4+ Y CD8+ DE LOS T-TIL.....101

2.1. ANTECEDENTES	103
-------------------------	-----

2.2. RESULTADOS.....	105
PARTE 1.....	105
2.2.1. Los T-TIL CD4+ y CD8+ presentan diferencias en las secuencias CDR3 TRB	105
2.2.2. Análisis de la diversidad del repertorio de TCR de los T-TIL CD4+ y CD8+	112
2.2.3. Análisis de las secuencias CDR3 públicas y el nivel de convergencia en los T-TIL CD4+ y CD8+	117
PARTE 2.....	126
2.2.4. Estudio de la similitud de secuencias CDR3 en los T-TIL CD4+ y CD8+	126
2.2.5. Caracterización de motivos CDR3 TRB significativamente expandidos en los repertorios de T-TIL CD4+ y CD8+	131
2.2.6. Uso de los motivos CDR3 TRB como herramienta para identificar T-TIL específicos de tumor	135
2.3. DISCUSIÓN	141
2.4. FIGURAS SUPLEMENTARIAS	147
CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN DEL REPERTORIO DE PÉPTIDOS ASOCIADOS A HLA-DR PRESENTADOS POR MODCS PULSADAS CON EXTRACTOS DE UNA LÍNEA TUMORAL DE CÁNCER DE MAMA.....	153
3.1. ANTECEDENTES	155
3.2. RESULTADOS.....	157
3.2.1. Análisis de solapamiento de los péptidos y sus proteínas de origen en ambos alelos de una misma muestra de MoDC	157
3.2.2. Análisis de solapamiento de los péptidos y las proteínas de origen en distintos alelos y muestras de MoDC.....	163
3.2.3. Solapamiento de las proteínas asociadas a HLA-DR*03:01 y HLA-DR*13:02 en MoDC	166
3.2.4. Efecto de la combinatoria alélica en la presentación de proteínas de un extracto de la línea celular tumoral MCF-7	172
3.3. DISCUSIÓN	177
CAPÍTULO IV. ESTUDIO DE LINFOCITOS B EPSTEIN-BARR VIRUS+ INFILTRANTES DE TUMOR EN LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN CÁNCER DE MAMA: INFORME DE UN CASO	183
4.1. ANTECEDENTES	185
4.2. RESULTADOS.....	187
4.2.1. El tumor generado en un PDX derivado de un tumor de mama fue el resultado de una expansión monoclonal de B-TIL EBV+	187
4.2.2. La línea XAL-LCL mostró capacidad de mantener T-TILs tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i>	190
4.2.3. Caracterización de los péptidos asociados a HLA presentados por la línea XAL-LCL....	198
4.3. DISCUSIÓN	201
DISCUSIÓN FINAL.....	205
CONCLUSIONES	207
ANEXOS	209
A1. TABLAS SUPLEMENTARIAS CAPÍTULO I	211
A2. TABLAS SUPLEMENTARIAS CAPÍTULO II.....	225
A3. TABLAS SUPLEMENTARIAS CAPÍTULO III	229
BIBLIOGRAFÍA	303

Abreviaciones

aa	Aminoácido
ACT	Terapia celular adoptiva (<i>Adoptive cell therapy</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC	Célula presentadora de antígeno (<i>Antigen presenting cell</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
BCR	Receptor de linfocito B (<i>B cell receptor</i>)
Breg	Linfocito B regulador
B-TIL	Linfocito B infiltrante de tumor (<i>Tumor infiltrating B lymphocyte</i>)
°C	Grados centígrados
CAR	Receptor de antígenos quiméricos (<i>Chimeric antigen receptor</i>)
CD	Grupo de diferenciación (<i>Cluster of differentiation</i>)
CDR3	Regiones determinantes de la complementariedad 3 (<i>Complementary determining region 3</i>)
CM	Cáncer de mama
CMLA	Cáncer de mama luminal A
CMLB	Cáncer de mama luminal B
CMTN	Cáncer de mama triple negativo
CR	Recombinación convergente (<i>Convergent recombination</i>)
CTL	Linfocito T citotóxico (<i>Cytotoxic T lymphocyte</i>)
CTLA-4	Proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (<i>Cytotoxic T lymphocyte associated protein 4</i>)
DC	Células dendríticas (<i>Dendritic cells</i>)
DN	Timocito doble negativo (<i>Double negative thymocyte</i>)
DP	Timocito doble positivo (<i>Double positive thymocyte</i>)
EBV	Virus Epstein-Barr (<i>Epstein-Barr virus</i>)
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC	Isocianato de fluoresceína
FoxP3	Factor de transcripción <i>forkhead box P3</i>

g	Fuerza g
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (<i>Granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>)
H&E	Hematoxilina y eosina
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>)
HLA	Antígeno leucocitario humano (<i>Human leukocyte antigen</i>)
HLA-I	Antígeno leucocitario humano de clase I (<i>Human leukocyte antigen class I</i>)
HLA-II	Antígeno leucocitario humano de clase II (<i>Human leukocyte antigen class II</i>)
HLA-ABC	Antígeno leucocitario humano A, B y C
HLA-DR	Antígeno leucocitario humano DR
HSC	Célula pluripotente hematopoyética (<i>Hematopoietic stem cell</i>)
HTS	Secuenciación de alto rendimiento (<i>High-throughput sequencing</i>)
IC	Punto de control inmunológico (<i>Immune checkpoint</i>)
ICI	Inhibidor de punto de control inmunológico (<i>Immune checkpoint inhibitor</i>)
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IHC	Inmunohistoquímica (<i>Immunohistochemistry</i>)
IL	Interleucina
LB	Linfocito B
LCL	Línea celular linfoblastoide (<i>Lymphoblastoid cell line</i>)
LT	Linfocito T
MB	Unión de afinidad intermedia (<i>Medium binder</i>)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (<i>Major histocompatibility complex</i>)
MHC-I	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (<i>Major histocompatibility complex class I</i>)
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (<i>Major histocompatibility complex class II</i>)
min	Minutos
mM	Milimolar

MS	Espectrometría de masas (<i>Mass spectrometry</i>)
μM	Micromolar
NB	Sin afinidad de unión (<i>No binder</i>)
N(D)N	Región de unión de los genes V, D y J del TCR donde se produce la adición y delección aleatoria de nucleótidos en el CDR3
NGS	Secuenciación de nueva generación (<i>Next generation sequencing</i>)
NK	Linfocito <i>natural killer</i>
NKT	Linfocito <i>natural killer</i>
nt	Nucleótido
OLS	Órganos linfoides secundarios
PBL	Linfocitos de sangre periférica (<i>Peripheral blood lymphocytes</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica (<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PD-1	Receptor de muerte celular programada 1 (<i>Programme cell death 1</i>)
PD-L1	Ligando de muerte celular programada 1 (<i>Programme cell death ligand 1</i>)
PD-L2	Ligando de muerte celular programada 1 (<i>Programme cell death ligand 2</i>)
PDX	Xenoinjerto derivado de paciente (<i>Patient derived xenograft</i>)
PE	Ficoeritrina (<i>Phycoerythrin</i>)
PerCP	Proteína clorofila peridinina
PGE-2	Prostaglandina E-2
p-MHC	Complejo formado entre una molécula de MHC y un péptido
PSM	Coincidencia de espectro peptídico (<i>Peptide-spectrum match</i>)
RE	Retículo endoplasmático
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SB	Unión de afinidad fuerte (<i>Strong binder</i>)
sFas	Receptor Fas soluble

sFasL	Ligando soluble del receptor Fas
SFB	Suero fetal bovino
SP	Timocito simple positivo (<i>Single positive</i>)
Ta	Temperatura ambiente
TAA	Antígenos asociados a tumor (<i>Tumor associated antigens</i>)
TCR	Receptor de célula T (<i>T cell receptor</i>)
Tfh	Linfocito T colaborador folicular (<i>T follicular helper cells</i>)
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta (<i>Transforming growth factor beta</i>)
Th	Linfocito T cooperador (<i>T helper</i>)
TIL	Linfocito infiltrante de tumor (<i>Tumor infiltrating lymphocyte</i>)
TN	Triple negativo
TNF	Factor de necrosis tumoral (<i>Tumor necrosis factor</i>)
TRA	Locus alfa del receptor de células T (<i>T cell receptor alpha locus</i>)
TRAC	Región constante alfa del receptor de células T
TRAJ	Región de unión (<i>joining</i>) alfa del receptor de células T
TRAV	Región variable alfa del receptor de células T
TRB	Locus beta del receptor de células T (<i>T cell receptor beta locus</i>)
TRBC	Región constante beta del receptor de células T
TRBJ	Región de unión (<i>joining</i>) beta del receptor de células T
TRBV	Región variable beta del receptor de células T
Treg	Linfocitos T reguladores
Trm	Linfocito T de memoria residente en tejido (<i>Tissue resident memory T cell</i>)
TSA	Antígenos específicos de tumor (<i>Tumor specific antigens</i>)
T-TIL	Linfocito T infiltrante de tumor (<i>Tumor infiltrating T lymphocyte</i>)
V(D)J	Región de los genes V, D y J recombinados del receptor de linfocitos T
WB	Unión de afinidad débil (<i>Weak binder</i>)
XAL	Linfoma asociado al xenoinjerto (<i>Xenograft associated lymphoma</i>)

Resumen

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en mujeres y a pesar de que en las últimas décadas la tasa de supervivencia ha incrementado, algunos tipos de tumores, especialmente aquellos que no expresan receptores hormonales como el triple negativo, siguen sin alternativas terapéuticas. El estudio del sistema inmunitario puede ayudar a desarrollar otras opciones de tratamiento. Prueba de ello es que los tratamientos basados en la inmunoterapia están dando buenos resultados en ciertos tipos de cáncer, aunque algunos pacientes siguen sin responder a las terapias. Incluso en aquellos tumores que presentan una ratio de linfocitos T CD8+/Treg infiltrantes alta – considerada un buen marcador pronóstico en cáncer de mama – no siempre se asegura una buena resolución. Por otro lado, se ha reportado que el estudio del repertorio de TCR puede tener un valor pronóstico y predictivo de evolución de la enfermedad, así como de respuesta a tratamiento. Estos antecedentes indican que mejorar la comprensión de la respuesta anti-tumoral, así como la funcionalidad de los tipos celulares que la realizan puede ayudar a desarrollar mejores tratamientos. El análisis del repertorio de TCR podría ayudar a su comprensión. La gran variabilidad del repertorio de TCR y su modificación a lo largo de la vida por varios factores tales como la edad, el historial de vacunación, de infección u otras enfermedades, la presencia de autoinmunidad o la inmunomodulación que causan ciertos tratamientos, dificulta su estudio.

El repertorio de TCR está altamente asociado al haplotipo de HLA de los individuos, el cuál lo configura ya desde su origen en el timo. En el sitio del tumor, el repertorio estará influenciado por la presencia de antígenos inmunogénicos capaces de activar una respuesta inmune y presentados en forma de péptidos formando complejo con las moléculas HLA. Por lo tanto, el haplotipo es un factor determinante del repertorio de TCR. La presencia de células dendríticas es importante para la activación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ dada su capacidad de presentar péptidos a través de HLA-II y HLA-I, respectivamente. Debido a que la expresión de las moléculas de HLA-II está limitada a las APC, su presencia es especialmente necesaria para la activación de las células T CD4+. Otros factores externos como la presencia de virus altamente frecuentes en la población, e. g., miembros de la familia herpesviridae, pueden tener un papel relevante en la configuración de la respuesta especialmente cuando éstos afectan a células del sistema inmune.

La respuesta anti-tumoral requiere la activación tanto de linfocitos T CD4+, cruciales para la orquestación inicial, sustentación de la respuesta y generación de memoria inmunológica, como de linfocitos T CD8+, por su capacidad de lisar específicamente las células tumorales. Teniendo todo esto en cuenta, esta tesis doctoral ha tenido como objetivo el estudio de linfocitos infiltrantes de tumor en distintos tipos de tumores de

cáncer de mama, enfocado en los subtipos celulares CD4+ y CD8+ y con especial interés en el análisis del repertorio de TCR en dichos subtipos. Por otro lado, se ha realizado una primera prueba de concepto orientada en el estudio del repertorio presentado por distintos alelos de HLA-DR en células dendríticas pulsadas con material de un extracto de línea celular tumoral, con el fin de determinar si existen ciertas diferencias en función de los alelos. Por último, se han analizado linfocitos B EBV+ infiltrantes de tumor en cáncer de mama, obtenidos a partir de un linfoma de células B asociado a un xenoinjerto para estudiar el papel de los linfocitos B como células presentadoras de antígeno y mantener la respuesta de ciertos linfocitos T.

Introducción

I. Cáncer de mama

El cáncer de mama (CM) es el cáncer más frecuente en mujeres y el más prevalente en el mundo según datos de la OMS. En 2020, se diagnosticaron 2.3 millones de mujeres y tiene una incidencia creciente^{1,2}. En el mismo año, murieron alrededor de 685000 mujeres debido a la enfermedad¹. De forma global en los últimos años la incidencia de cáncer de mama ha aumentado y su mortalidad ha disminuido debido a la eficacia de los programas de detección precoz y a la mejoría de los tratamientos de los que se disponen. La mortalidad varía enormemente alrededor del mundo; los países de altos ingresos tienen mayor incidencia aunque menor mortalidad, mientras que sucede a la inversa en los países con menores ingresos., aunque la menor incidencia suele asociarse a una menor detección³⁻⁵.

El diagnóstico temprano es un factor determinante en la supervivencia debido a que los tumores en estadios tempranos, es decir, sin enfermedad fuera de la mama y de los linfonodos regionales, tiene una alta probabilidad de curación con una supervivencia global cerca del 80 %⁵. Sin embargo, los tumores de mama metastásicos son tratables, pero raramente curables y los tratamientos de los que se disponen pretenden prolongar los años de supervivencia y mejorar la calidad de vida⁵.

I.1. Tipos de cáncer de mama y etiología

El CM es un tipo de cáncer altamente heterogéneo pero las técnicas de expresión génica diferencian principalmente cuatro grandes subtipos moleculares con diferencias en su pronóstico, así como de respuesta a los tratamientos disponibles⁶: CM de tipo luminal A (CMLA), CM de tipo luminal B (CMLB), CM basal-like; y CM enriquecidos en HER2 (del inglés, *human epidermal growth factor receptor 2*). En la práctica clínica no se dispone de los perfiles de expresión génica por lo que se han descrito definiciones extrapolables de estos subtipos basados en la expresión, principalmente por inmunohistoquímica, de los principales biomarcadores de cáncer de mama: los receptores de estrógeno (ER) y progesterona (PR), el receptor HER2 y Ki-67 (marcador de proliferación) (ver Tabla 1). Los CMLA y CMLB son ER+ y/o PR+, los primeros suelen tener una alta expresión de PR y de Ki-67 bajo, en comparación con los CMLB; los enriquecidos en HER2, además de sobreexpresar HER2 suelen tener un perfil ER- y PR-; y la mayoría de tumores basal-like son ER-, PR-, HER2-, aunque no todos (aproximadamente un 20 % expresan ER+ o sobre expresan HER2)^{7,8}. Por último, los tumores triples negativos (CMTN) no expresan ni ER ni PR ni HER2, presentando un peor pronóstico dado que no responden a tratamientos hormonales⁵. Es importante remarcar que, a pesar de que los CMTN y los basal-like pueden tener el mismo perfil molecular (ER-PR-HER2-), son tipos de tumores distintos, diferenciados por su perfil génico⁹.

Tabla 1. Subtipos moleculares de cáncer de mama y la expresión de los receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) y HER2.

Subtipo molecular	Expresión de receptores
Luminal A	ER+ y/o PR+ (alto) HER2- Ki-67 (bajo)
Luminal B	ER+ y/o PR+ (bajo) HER2- Ki-67 (alto)
Luminal B HER2-	
Luminal B HER2+	ER+ y/o PR+ HER2+
HER2-enriquecido	ER- PR- HER2 sobreexpresado
Triple negativo	ER-PR- HER2-

La etiología del cáncer de mama sigue sin comprenderse del todo, debido a que pueden intervenir múltiples factores endógenos y exógenos. A partir del conocimiento de ciertos factores de riesgo se han podido establecer algunas vías y mecanismos relacionados con su desarrollo¹⁰. Entre ellos, de los más importantes y mejor conocidos son el papel de los niveles de estrógenos y la predisposición genética.

Muchos de los factores de riesgo asociados al cáncer de mama tienen una estrecha relación con la exposición a estrógenos, tales como una menarquia temprana o una menopausia tardía¹⁰. Además, se ha demostrado que otros factores que incrementan los niveles de estrógenos, tales como la ingesta de alcohol o la obesidad, están asociados a un mayor riesgo^{11,12}. Sin embargo, altos niveles de estrógenos durante el embarazo están asociados a un menor riesgo¹³, demostrando que no solamente es relevante la exposición sino durante cuánto tiempo y en qué momento y condición se produce¹⁰.

Por otro lado, alrededor del 10 % de los tumores de mama tienen un origen hereditario. Los genes asociados al cáncer de mama pueden clasificarse en función de su grado de penetrancia⁽¹⁾ ¹⁴. Entre los de alta penetrancia se encuentran BRCA1– el primer gen asociado al cáncer de mama hereditario¹⁵ – y BRCA2¹⁶, así como otros genes como PTEN^{17,18}, TP53^{19–21}, CDH1²² y STK11²³. A pesar de que estas

¹ La penetrancia se define como la proporción de individuos que expresa un fenotipo concreto asociado a un cambio genético entre todos los individuos que lo presentan.

mutaciones son raras, son las causantes de la mayoría de los tumores de mama de tipo familiar. Otros genes de moderada y baja penetrancia también han sido descritos¹⁴.

I.2. Tratamiento

El tratamiento del CM en estadios iniciales se basa en la resección quirúrgica, pero en prácticamente todos los casos se utilizan otros tratamientos complementarios para mejorar las opciones quirúrgicas y para reducir riesgo de una recidiva posterior. Los tratamientos que se utilizan y el orden en el que se administran dependen principalmente del estadio inicial y del subtipo tumoral. Los tratamientos complementarios a la cirugía que se utilizan principalmente son: la terapia endocrina, la radioterapia, la quimioterapia y la inmunoterapia. Los tratamientos sistémicos (quimioterapia, inmunoterapia y tratamiento hormonal) pueden suministrarse antes (terapia neoadyuvante) o después de la cirugía (terapia adyuvante). La terapia neoadyuvante suele darse en aquellos casos en los que es necesario o preferible reducir el tamaño tumoral antes de la cirugía, así como en los que se ha descrito que un tratamiento prequirúrgico puede mejorar el pronóstico y modificar la secuencia de tratamientos posteriores (como en tumores HER2+ y CMTN)²⁴. En todos los tumores ER+ y/o PR+, se administra como terapia endocrina bloqueantes de los ER, así como en los tumores HER2+ se administran anticuerpos monoclonales bloqueantes de HER2.

A pesar de que el diagnóstico y tratamiento de los CM ha mejorado notablemente en los últimos años, todavía hay una considerable proporción de pacientes que muestran resistencia a las terapias convencionales. Se ha sugerido que la capacidad de resistencia en tumores tempranos pueda ser debida a una presión evolutiva ejercida por los propios tratamientos²⁵⁻³⁹. Los CMTN son los tumores más difíciles de tratar, ya que no se disponen de biomarcadores específicos que puedan ser utilizados como diana terapéutica (como los ER y PR en los tumores luminales o HER2 en los tumores HER2 positivos). Aunque existen algunos tratamientos⁴⁰, no siempre funcionan con éxito, por lo que sigue siendo necesario encontrar nuevas terapias y es de vital importancia la investigación clínica y preclínica. Recientemente la inmunoterapia ha demostrado efectividad en algunos casos de CMTN⁴¹, suponiendo un gran avance para este tipo de tumor agresivo y sin opción a tratamientos.

I.2.1. Introducción a la inmunoterapia

La inmunoterapia anti-tumoral tiene como objetivo restaurar la respuesta inmunitaria frente a los tumores. En CM ha demostrado beneficio de forma limitada, pero tiene un alto potencial y se está evaluando en múltiples ensayos clínicos en diferentes contextos de la enfermedad. En general, estos se clasifican en cuatro grandes grupos: anticuerpos monoclonales; vacunas contra el cáncer; transferencia celular adoptiva

Introducción

(ACT, del inglés *adoptive cell transfer*) e inhibidores de puntos de control (ICI, del inglés, *immune checkpoint inhibitors*).

Los anticuerpos monoclonales son probablemente los más usados en la clínica y entre los mecanismos de acción más comunes se encuentran: la alteración de la señalización celular mediante el bloqueo o activación de receptores expresados en las células malignas y su opsonización mediante un *target* celular⁴². El uso de conjugados con una toxina (a la cual es sensible la célula diana) o de anticuerpos biespecíficos que aproximan las células malignas a otros tipos celulares, como los linfocitos T (LT), para su destrucción⁴² son otras variantes de este tipo de tratamientos.

Las vacunas contra el cáncer pueden ser preventivas o terapéuticas. Las preventivas se basan en la inducción de una respuesta inmunológica de memoria para prevenir un futuro cáncer, mientras que las terapéuticas suelen tener como objetivo un incremento en la presentación de los antígenos tumorales para reactivar la respuesta. Sin embargo, requieren de un antígeno conocido y que solamente se exprese en las células malignas. Por ello, las más exitosas son aquellas en las que el antígeno es un péptido viral oncogénico, como el virus del papiloma humano asociado al cáncer de cérvix⁴³.

En tercer lugar, las terapias de ACT consisten en la infusión de células del sistema inmune a los pacientes con cáncer con el fin de reactivar o mejorar la respuesta. En general, éstas se dividen en cuatro subgrupos: (i) la transferencia de linfocitos infiltrantes de tumor (o TIL, del inglés *tumor infiltrating T lymphocytes*); (ii) de CAR-T-cells (del inglés, *chimeric antigen receptor T cells*); (iii) basadas en receptores de células T (TCR, del inglés *T cell receptor*) modificados genéticamente y (iv) la terapia celular con células *natural killer* (NK).

En último lugar, los ICI han sido la revolución de los últimos diez años en terapias contra el cáncer. Las primeras observaciones fueron realizadas por J. Allison y T. Honjo, dedicados a la investigación de los correceptores inhibidores de la respuesta CTLA-4 (del inglés, *cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*)⁴⁴⁻⁴⁶ y PD-1 (del inglés *programmed cell death protein 1*)⁴⁷⁻⁵⁰, respectivamente. Ambas proteínas expresadas por los LT tienen como función biológica la regulación de la respuesta mediante su inactivación, aunque con mecanismos distintos (explicados más detalladamente en los apartados siguientes). A pesar de que sus estudios se remontan a los principios de los 90, no fue hasta 2011 que la FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó el uso del CTLA-4 como tratamiento, seguido por el de PD-1 en 2014. En los siguientes años, un número impresionante de ensayos clínicos con ICI se han llevado – y siguen llevándose – a cabo⁵¹, aunque los resultados más prometedores se han observado en el tratamiento de melanoma⁵²⁻⁵⁴. La gran repercusión que ha tenido el descubrimiento de estas moléculas en el tratamiento del cáncer les hizo merecedores del Premio Nobel de Medicina en 2018.

I.2.2. Inmunoterapia en cáncer de mama

En los últimos años se han dado muchos avances en el desarrollo de terapias para el tratamiento del CM⁵⁵. En la actualidad, los tratamientos de inmunoterapia aprobados para su uso en algunos tipos de tumores de mama son anticuerpos monoclonales y ICI⁵⁶. En el primer grupo, la mayoría de ellos son anti-HER2 bloqueantes (e. g., trastuzumab o pertuzumab) o conjugados a medicamentos quimioterapéuticos (trastuzumab-deruxtecan) y algunos de ellos con importantes resultados en cuanto a supervivencia libre de progresión y supervivencia global⁵⁷⁻⁶⁰. Por otro lado, recientemente se ha aprobado el uso de dos tratamientos con ICI. Concretamente, el uso de anti-PD-1 y anti-PD-L1 (pembrolizumab y atezolizumab, respectivamente) han sido aprobados en combinación con quimioterapia para ciertos tipos de tumores, i. e., TN metastásicos PD-L1+ y en CMTN precoz de alto riesgo.

La variedad de inmunoterapias en ensayos clínicos es mucho mayor, a pesar de que la mayoría siguen estando focalizados en la evaluación de nuevos anticuerpos monoclonales y de ICI, ya sea solos o en combinación con otros fármacos^{56,61-66}. Hasta la fecha se han realizado ensayos clínicos usando prácticamente todos los tipos de inmunoterapia conocidos^{55,56,67}. Sin embargo, muchos de ellos no están actualmente aprobados para la clínica y/o todavía no se han obtenido resultados concluyentes. Cabe remarcar que muchos de los ensayos clínicos y estudios basados en inmunoterapia se están realizando en CMTN, debida a la falta de opciones terapéuticas que presentan este tipo de tumores^{40,68,69}.

Los TIL en cáncer de mama han demostrado tener un valor predictivo pronóstico de neoadyuvancia⁷⁰, adyuvancia^{71,72} y metástasis⁷³ en CM TN y HER2+ y, de hecho, su estudio mediante IHC se realiza de forma rutinaria durante el diagnóstico⁷⁴. Esto indicaría que los TIL ejercen una función protectora contra el crecimiento tumoral, y, por lo tanto, que el CM es susceptible a ser tratado mediante ACT de TIL. Se han realizado algunos estudios con éxito en pacientes con CM metastásico mediante transferencia de TIL autólogos⁷⁵, así como con transferencia de células NKT⁷⁶ (del inglés, *natural killer T cells*). Sin embargo, todavía no existen suficientes datos como para poder ser usados de forma habitual en la clínica. Se sabe, por un lado, que una ratio CD8+/T reguladoras (Treg) alta es un buen marcador pronóstico⁷⁷, así como que la mayoría de TIL en CM son específicos de tumor, pero no en todos los casos un alto infiltrado de CD8+ asegura una buena evolución. Por ello, se ha sugerido que los TIL podrían estar inhibidos por señales supresoras en el microambiente tumoral⁷⁸.

Los CAR-T-cells son células T que contienen receptores quiméricos formados por anticuerpos unidos a un dominio transmembrana del complejo de TCR^{79,80}. Este receptor quimérico simula una activación clásica por reconocimiento del TCR, de modo que el receptor envía señales de activación a los LT cuando el anticuerpo se une a la diana celular. Este tipo de terapias han demostrado eficacia especialmente en

hemopatías malignas, i. e., leucemias, linfomas y mielomas^{79,81–83}, el éxito de las cuales radica en la expresión de antígenos específicos de linaje en las células diana, permitiendo su identificación (e. g. linfomas de tipo B pueden ser tratados mediante CAR-T cells específicos para CD19⁸⁴). En tumores sólidos como el CM, el desarrollo de terapias con CAR-T-cells supone un desafío, debido a que deben buscarse dianas celulares que no afecten al resto de células sanas, o no de forma grave. Sin embargo, existen algunos ensayos clínicos en desarrollo en el cual se está probando la eficacia de CAR-T-cells, e. g., mediante el reconocimiento de TP53 (*tumor protein 53*), KRAS (*kirsten rat sarcoma virus*), cMET (tirosina cinasa Met) o de la mesotelina⁴⁰.

II. La respuesta inmunitaria adaptativa celular

El sistema inmunitario se puede dividir en dos tipos de respuesta coordinadas; la respuesta innata y la respuesta adaptativa. La primera, es crucial para el reconocimiento rápido de señales de infección o peligro, conocidas como PAMP y DAMP (del inglés, *pathogen-associated molecular patterns* y *danger-associated molecular patterns*). Los PAMP son estructuras que se encuentran presentes en patógenos de un mismo tipo, mientras que los DAMP son moléculas propias que generalmente no se encuentran en el medio extracelular y que aparecen cuando se produce un daño. Pese a que su primera función es la activación de una respuesta rápida, es también la responsable de activar a las células de la inmunidad adaptativa, la cual genera una respuesta antígeno-específica y memoria inmunológica. Los linfocitos son las células que llevan a cabo la inmunidad adaptativa y se dividen en dos grandes grupos: los linfocitos B (LB), generadores de la respuesta humoral o mediada por anticuerpos, y los LT, encargados de la respuesta celular. Ambos presentan receptores específicos de antígenos en sus membranas conocidos como receptores de LB (BCR, del inglés *B cell receptor*) y receptores de LT (TCR). Los BCR son inmunoglobulinas (Ig) de membrana capaces de reconocer antígenos nativos, mientras que los TCR, también formados por proteínas de la familia de las Ig, reconocen antígenos procesados (péptidos) y presentados a través de moléculas de MHC (del inglés *Major histocompatibility complex*), por lo que requieren de células presentadoras de antígenos (APC, del inglés *Antigen Presenting Cells*) para su activación. Dentro de los LT se encuentran varias subpoblaciones, siendo los dos grupos principales los LT CD4+ o cooperadores (Th, del inglés *T helper*) y los LT CD8+ o citotóxicos (CTL, del inglés *cytotoxic T lymphocyte*).

II.1. Linfocitos T

II.1.1. Ontogenia de los linfocitos T

Los LT se originan a partir de células progenitoras linfoides (CLP, del inglés *common lymphoid progenitor*) a su vez descendientes de células madre hematopoyéticas (HSC, del inglés, *hematopoietic stem cell*). La conversión a célula progenitora de LT se da en la

médula ósea, pero éstas migran hacia el timo como células pro-T, donde empiezan un proceso de proliferación, maduración y selección conocido como selección tímica. Este proceso se conoce mayoritariamente en las células T con un TCR $\alpha\beta$, que es el que se explica brevemente a continuación.

En el núcleo de las células pro-T, que en los primeros estadios son células doble negativas (DN), llamadas así por la ausencia de expresión de las moléculas CD4+ y CD8+, se empieza la reordenación de los genes de los TCR por el reordenamiento de la cadena β . Una vez expresada, momento en que se las conoce como pre-T, se empieza el reordenamiento de los genes de la cadena α . Las células que hayan reordenado y expresado un TCR maduro correctamente, conocidas como timocitos doble positivos (DP), también expresan en su membrana los dos correceptores CD4+ y CD8+. Los timocitos DP migran entre las células epiteliales tímicas corticales que presentan péptidos propios unidos a las moléculas de MHC, en humanos denominados antígenos leucocitarios humanos (HLA, del inglés *human leukocyte antigen*). Durante este proceso, conocido como selección positiva, los timocitos capaces de reconocer complejos péptido-MHC (p-MHC), conservarán uno de los dos correceptores, CD4+ o CD8+ en función de la molécula de MHC que hayan reconocido: de clase II (MHC-II) o de clase I (MHC-I), respectivamente. Los timocitos positivamente seleccionados en esta primera fase, o timocitos *single positive* (SP), migran hacia la médula tímica, donde se produce la selección negativa. Durante ésta, se prueba la afinidad de reconocimiento de péptidos derivados de proteínas propias presentados por las células epiteliales de la médula tímica (mTEC) gracias a factores de transcripción como AIRE. Juntamente con éstas, participan en la selección las células dendríticas (DC) del timo. Los timocitos SP que reconocen autoantígenos con alta afinidad mueren por apoptosis, mientras que aquellos capaces de interactuar con los complejos p-MHC con afinidades bajas o intermedias, sobreviven y emigran a la periferia⁸⁵. Este proceso forma parte de la tolerancia central, la función de la cual es evitar el reconocimiento de las proteínas propias, aunque una vez en circulación existen otros mecanismos de tolerancia periférica que terminan de modular el repertorio de LT.

II.1.2. Activación y función

En periferia, los LT se mantienen como célula naïve y se activan cuando el TCR de una célula reconoce específicamente un péptido antigénico presentado por el MHC en la superficie de una APC. Mientras que las moléculas MHC de clase I presentan péptidos a los LT CD8+, las de clase II son reconocidas por los LT CD4+. Los TCR están íntimamente asociados al complejo CD3 (formado por las cadenas polipeptídicas ϵ , γ y δ ; asociadas a un cuarto componente denominado cadena ζ), formando el complejo TCR-CD3. Este complejo se asocia, a su vez, a los correceptores CD4+ o CD8+. La respuesta mediada por los LT se puede dividir en

Introducción

cuatro fases: (i) el reconocimiento antigénico; (ii) la activación celular; (iii) la activación de la función efectora y; (iv) la regulación de la respuesta.

La activación de la respuesta por parte de los LT naïve (es decir, de LT que no han contactado anteriormente con antígenos) se produce en los órganos linfoides secundarios (OLS) y requiere tres señales coordinadas: la interacción del TCR con el complejo p-MHC; la señalización por moléculas coestimuladoras y la detección de citocinas (resultado de la inmunidad innata) y señales de adhesión. La primera señal se produce por la interacción entre el TCR y el complejo p-MHC presentado por una APC. Durante esta unión, los correceptores CD4 o CD8 también interactúan con dicho complejo, iniciando una cascada de señalización celular en el interior de los LT que empieza con la fosforilación de los motivos ITAM del CD3. La segunda señal es originada por la interacción de las moléculas CD80 y CD86 presentes en las membranas de las APC y que interactúan con CD28, su ligando expresado en los LT. Esta señal activa la cascada de señalización de las MAP cinasas, o vía MAPK (del inglés, *mitogen-activated protein kinases*). La primera y la segunda señal, que se producen de forma conjunta, conducen a la activación de los factores de transcripción NFκB, NFAT y AP-1, los cuales inducen la transcripción de genes relacionados con la proliferación celular y la secreción de citocinas, entre otros. En último lugar, las APC producen distintas citocinas que actúan como tercera señal, induciendo la diferenciación de los LT a células efectoras (Teff). La tercera señal, induce la expresión de los factores de transcripción responsables del desarrollo de las distintas subpoblaciones de Teff y definitorios del linaje celular. Los LT CD4+ son diferenciados a distintos subtipos de Th – siendo los más reconocidos los Th1, Th2, T helper foliculares (Tfh) y Th17 – así como a Treg. Cada uno de estos subtipos está definido por unas funciones concretas, así como por un patrón de secreción de citocinas y un factor de transcripción, explicado en más detalle en Antecedentes del capítulo I. En resumen, las APC generan un microambiente dependiendo del estímulo iniciador de la respuesta, activando, a su vez, un determinado grupo de Teff. Este proceso asegura la activación adecuada de los Teff necesarios en dicho contexto.

La activación de los LT es crucial para prácticamente todas las funciones de la inmunidad adaptativa y estos se pueden dividir en distintos subtipos dependiendo de su función en la respuesta. Mientras que los LT CD8+ o CTL son capaces de mediar una respuesta directa contra células infectadas o dañadas, los LT CD4+ o Th son cruciales para la orquestación de la respuesta inmunitaria y estimulación de los LB – y su posterior producción de anticuerpos – entre otros tipos de células que también pueden ser activadas o dirigidas por los Th^{86,87}. Por último, los Treg, que son parte de los mecanismos de regulación de la respuesta, son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis y la finalización de la respuesta inmunitaria. A pesar de que la mayoría de los Teff mueren tras la eliminación del antígeno (y, por lo tanto, del

patógeno o elemento desencadenante), algunos permanecen convirtiéndose en LT de memoria (T_m), necesarios para la inmunidad a largo plazo.

II.1.3. Receptores de linfocitos T

Los TCR son glicoproteínas transmembrana heterodiméricas formadas por la combinación de una cadena alfa y una cadena beta ($TCR\alpha\beta$), o una cadena gamma y una cadena delta ($TCR\gamma\delta$), y unidas por puentes disulfuro. Son expresados de forma exclusiva en LT y la mayoría de ellos – alrededor de un 95 % – están formados por el heterodímero $TCR\alpha\beta$. Los ectodominios $TCR\alpha$ y $TCR\beta$ están compuestos por un dominio variable ($V\alpha$ y $V\beta$), el cuál es crítico para el reconocimiento peptídico, y un dominio constante ($C\alpha$ and $C\beta$).

Los genes que codifican para las cadenas α y β (TRA y TRB, respectivamente) están compuestos por segmentos múltiples no-contiguos, nombrados segmentos V, D y J (del inglés *variable*, *joining* y *diversity*, respectivamente). Los segmentos V y J se encuentran tanto en los genes TRA como en los TRB, mientras que el segmento D solamente se encuentra en estos últimos. Durante la selección tímica, los genes del TCR son sometidos a una recombinación de los segmentos V(D)J en la cual segmentos V y J de la cadena α y segmentos V, D y J de la cadena β se recombinan entre ellos formando secuencias codificantes del dominio variable. Esta recombinación se inicia por acción de las enzimas RAG1/RAG2 (del inglés, *recombination-activating genes*) e intervienen un conjunto de enzimas que la dirigen. Seguidamente, esta secuencia se recombina con un segmento C y finalmente dando lugar a un transcrito TRA o TRB funcional. Tanto los $TCR\alpha$ como los $TCR\beta$ contienen tres *loops* hipervariables en su estructura, nombrados CDR (del inglés *complementary determining regions*) 1, 2 y 3 (CDR1, CDR2 y CDR3)^{88,89} (Figura 1). Las regiones CDR1 y CDR2 son codificadas en la línea germinal, mientras que la región CDR3 está codificado en las regiones de unión V(D)J.

Durante la recombinación de estos segmentos se generan unas horquillas de ADN en las cuales se corta una de las cadenas de forma asimétrica, formando un segmento final de cadena sencilla que genera un sitio de unión para los denominados nucleótidos P. Por otro lado, la enzima TdT (del inglés, *terminal nucleotidyl transferase*) añade nucleótidos al azar (sin necesidad de una cadena molde) y los extremos de cadena simple de los segmentos V-D y D-J hibridan parcialmente. Mediante la síntesis de ADN y mecanismos de reparación, se genera la región N(D)N^{90,91}, proporcionando una alta hiper-variabilidad^{92,93} (Figura 2). Cabe añadir que en el TCR los segmentos D poseen tres marcos de lectura posibles, aumentando la diversidad del CDR3 para un mismo segmento D escogido. Todos estos procesos terminan generando un TCR compuesto por cadenas α y β específicas que determinan la especificidad del receptor.

Introducción

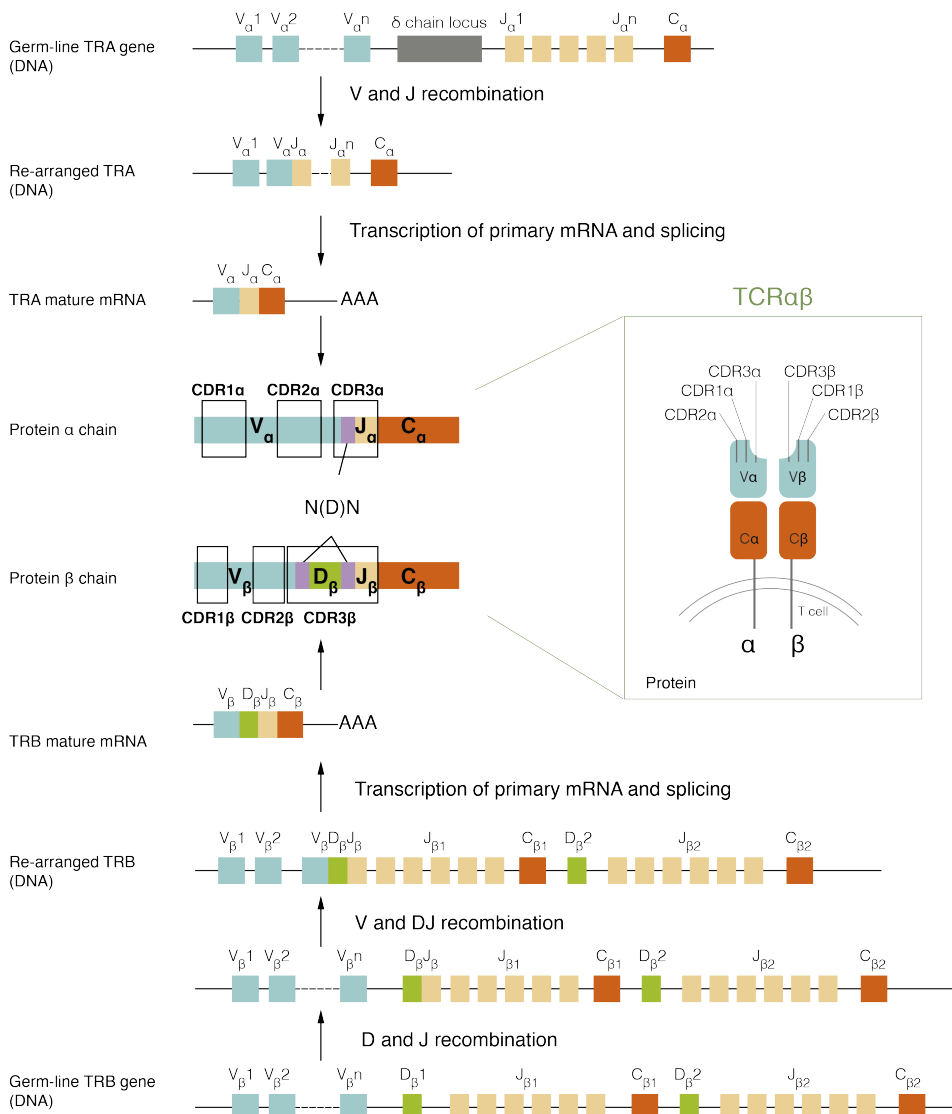


Figura 1. Estructura y generación del TCR. Los complejos TCR $\alpha\beta$ están compuestos por una cadena α y una cadena β , cada una de las cuales está constituida por un dominio variable ($V\alpha$ y $V\beta$) y un dominio constante ($C\alpha$ y $C\beta$). El dominio variable es generado por la recombinación de los segmentos V, D y J. Los segmentos $V\alpha$ y $J\alpha$ se recombinan para formar la cadena α (genes TRA), mientras que los segmentos $V\beta$, $D\beta$, y $J\beta$ se recombinan para formar la cadena β (genes TRB). Los dominios variables contienen tres regiones determinantes complementarias (CDRs): CDR1 y CDR2, que están codificados en la línea germinal, y CDR3, que sufre además una adición y delección aleatoria de nucleótidos y se encuentra en la región V(D)J recombinada. Imagen propia.

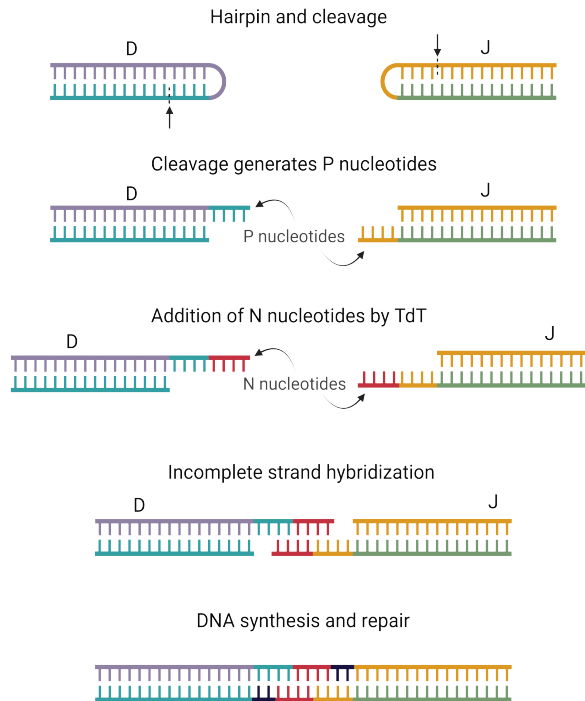


Figura 2. Generación de la diversidad de unión. En las horquillas de ADN en los segmentos que deben ser recombinados (V, D y J, en la figura D y J como ejemplo), por acción enzimática, se producen cortes desiguales en una de las cadenas, generando finales asimétricos, donde se añadirán los nucleótidos P. La enzima TdT añade nucleótidos al azar (nucleótidos N) y, finalmente, los segmentos se unen por una hibridación incompleta. Finalmente se ejecuta la maquinaria de síntesis y reparación del ADN para completar y corregir la unión de las dos cadenas. Creada en Biorender.com.

En la estructura terciaria del TCR, los CDR están expuestos en bucles en el extremo distal de la membrana, formando el sitio de unión al antígeno⁹⁴⁻⁹⁶ (Figura 3). El CDR3 se asienta principalmente sobre el péptido durante la interacción, por lo cual es considerada la región más importante en la determinación de la afinidad antigénica^{95,97}. La mitad N-terminal del péptido es mayoritariamente reconocida por el CDR3 de la cadena α , mientras que la otra mitad C-terminal es reconocida por el de la cadena β ^{95,96}. Por el contrario, los bucles formados en las regiones CDR1 y CDR2 contactan, sobre todo, con la molécula MHC^{95,97}. Tras la interacción, se produce un cambio en la configuración del complejo CD3 que inicia la cascada de señalización celular⁸.

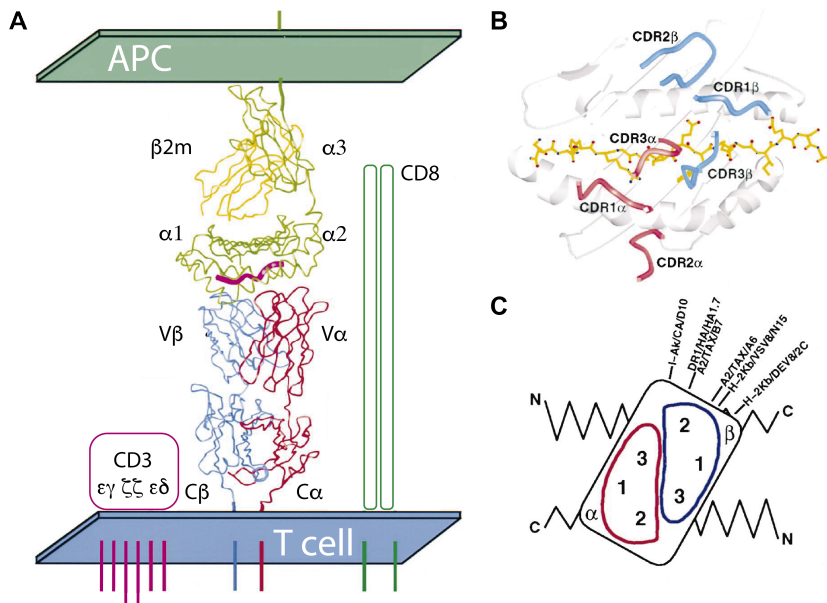


Figura 3. Estructura del complejo TCR e interacción de unión con el complejo p-MHC. (A) El complejo TCR-CD3 en la membrana de los LT, juntamente con el corresponsor CD4 o CD8 (en la figura, CD8 como ejemplo) interaccionan con los complejos p-MHC-II o p-MHC-I, respectivamente (en la figura p-MHC-I como ejemplo) en la membrana de las APC. (B) Los bucles en los que se encuentran CDR1 y CDR2 interaccionan mayoritariamente con la molécula MHC, mientras que los del CDR3 son los que más contactan con el péptido. (C) La región CDR3 de la cadena α interacciona con la región N-ter del péptido, mientras que la región CDR3 de la cadena β interacciona con la región C-ter. Adaptada de J. Hennecke and D. C. Wiley⁹⁸.

La variabilidad combinatoria de la recombinación V(D)J de los genes TRA y TRB y la generación de la región N(D)N, seguidos por el emparejamiento heterodimérico de distintas cadenas α y β , genera una amplia variabilidad de distintos TCR, asegurando el reconocimiento de una gran variedad de antígenos. El conjunto de secuencias TCR únicas en un individuo se conoce como el repertorio de TCR, configurado de forma temprana durante la selección tímica por lo que el repertorio periférico está compuesto por un conjunto de TCR que reconocen con baja afinidad los complejos p-MHC.

La variabilidad teórica del TCR, es decir, el conjunto de TCR que pueden llegar a formarse, es de entre 10^{15} y 10^{20} moléculas distintas. Sin embargo, y aunque solamente alrededor de un 3 % de los timocitos se seleccionan en el timo y migran a la periferia, la diversidad real en humanos es mucho menor, estimada en aproximadamente 10^7 clones distintos⁹⁹. Varios estudios han explicado este fenómeno tras demostrar que los procesos de recombinación no son completamente aleatorios, aunque se desconocen las razones exactas. De hecho, el uso de la región V durante la recombinación V(D)J está parcialmente sesgado además de que existe una influencia

de factores genéticos y epigenéticos en la composición del repertorio TCR preseleccionado¹⁰⁰. Por otro lado, la exposición a ciertos antígenos a lo largo de la vida de un individuo implica la expansión de clones específicos de TCR. Otros procesos que puedan involucrar inmunosupresión, como trasplantes^{101,102}, pueden generar una pérdida de la diversidad. Por ello, el repertorio de TCR de los individuos es dinámico, va disminuyendo con la edad y es condicionado por la exposición a antígenos¹⁰⁰.

II.2. Células presentadoras de antígeno

El papel principal de las APC es activar y dirigir la respuesta T mediante la presentación de antígenos a través de las moléculas de MHC. Mientras que las moléculas de MHC de clase I son expresadas por prácticamente todas las células del organismo, la expresión de MHC de clase II está limitada a las APC, tales como DC, macrófagos y LB, aunque también se encuentran en LT activados y en las células epiteliales del timo.

II.2.1. Células dendríticas

Las DC se originan a partir de células hematopoyéticas pluripotentes (HPC) en la médula ósea, pero pueden diferenciarse tanto a partir de una célula precursora mielóide como linfóide. Se encuentran, sobre todo, en tejidos en contacto con el exterior (tales como piel y las mucosas) así como en el estroma de los tejidos, mientras que su presencia en sangre periférica es baja y suelen encontrarse en un estado inmaduro. Existen distintos subtipos de DC y principalmente se clasifican en dos grupos: DC convencionales (cDC) y plasmacitoides (pDC)¹⁰³⁻¹⁰⁵. Aunque en un principio se nombró a las cDC como mieloides y a las pDC como linfoides, se ha probado que esta clasificación es errónea, ya que tanto cDC como pDC pueden ser generadas tanto *in vitro* como *in vivo* a partir de progenitores mieloides y linfoides y los distintos subtipos no dependen de su origen¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

Los distintos subtipos de DC se clasifican tanto a nivel molecular – por una expresión diferencial de marcadores – como a nivel funcional, aunque las DC son altamente plásticas y sus funciones no son exclusivas de un solo subgrupo¹⁰³. Asimismo, su clasificación está relacionada con las señales de peligro o moleculares que reconocen y, a su vez, con el patrón de citocinas que secretan. Si bien a través de la secreción de citocinas se dirige la diferenciación a T_{eff} (tercera señal de activación), este patrón está estrechamente condicionado por el subtipo de DC que lo secreta y, a su vez, con el tipo de señal reconocido. El reconocimiento diferencial viene dado, en gran parte, por los distintos PRR (del inglés, *pattern recognition receptors*) entre los cuales se encuentran los TLR (del inglés, *Toll-like receptors*). Los PRR son las moléculas encargadas del reconocimiento de PAMP y DAMP.

Introducción

Las cDC están subdivididas en dos grandes grupos: cDC1 y cDC2^{103,104}, y pueden reconocer tanto patógenos extracelulares como intracelulares, gracias a la gran variedad de TLR que expresan, i. e., entre los dos subtipos, de TLR1 a TLR10^{105,109,110}, receptores de una gran variedad de PAMP¹¹¹. Son las principales responsables de iniciar una respuesta T primaria. Las cDC1 están más asociadas a la inducción de la diferenciación a Th1, mientras que las cDC2, son capaces de inducir la diferenciación de todos los tipos de Th (Th1, Th2, Th17, Tfh y Treg)¹¹². Una de las características diferenciales de las cDC es su capacidad de realizar la presentación cruzada de péptidos, conocida como *cross-presentation*^{113–116}, esto es, la movilización de péptidos de la vía endocítica al citoplasma para ser presentados por las moléculas MHC-I. Por lo tanto, las cDC también tienen capacidad de activar una respuesta T CD8+. Tradicionalmente, se ha asociado la *cross-presentation* a las cDC1 aunque, en humanos, se han descrito otras subpoblaciones de DC con esta capacidad^{117–121}. Por otro lado, las pDC, morfológicamente parecidas a las células plasmáticas, son altamente sensibles a PAMP virales, debido a la expresión de TLR7 y TLR9^{110,111} y son capaces de secretar una gran cantidad de interferones de tipo I y III^{122,123}. Sin embargo, las pDC pueden convertirse en cDC-like tras su activación y actuar como APC.

Por último, existe un subtipo de DC que se generan a partir de monocitos tras su estimulación en circulación, también nombradas DC derivadas de monocitos o MoDC (del inglés, *monocyte-derived dendritic cell*)¹²⁴. Por su papel importante en la inflamación y la infección, también son conocidas como DC inflamatorias^{105,125}. La capacidad de diferenciación de los monocitos a DC es frecuentemente usada *in vitro* para la generación de estas células. Los monocitos obtenidos de sangre periférica, en presencia de GM-CSF (del inglés, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) e IL-4, se diferencian en DC no proliferativas inmaduras que, tras la incubación con citocinas pro-inflamatorias, pueden llegar a un fenotipo de DC madura, con una alta expresión de MHC-II y moléculas coestimuladoras¹²⁶.

Las DC median el puente entre la inmunidad innata y la adaptativa. Por un lado, tienen capacidad de reconocer patógenos mediante sus PRR, por otro, son las principales ejecutoras de la activación de los LT naïve y, por lo tanto, de la respuesta adaptativa. Estas funciones son realizadas dependiendo de su estado de activación¹²⁷. En condiciones normales, las DC se encuentran en un estado inmaduro, caracterizadas por una alta expresión de PRR y con una alta capacidad fagocítica. Tras el reconocimiento de PAMP, pasan a un estado activado, momento en el cual migran a los OLS proximales. Las DC en los tejidos linfoides se convierten en células DC maduras, caracterizadas por la pérdida de la función fagocítica, una alta expresión de moléculas MHC, así como de moléculas coestimuladoras, actuando como APC.

II.2.2. Linfocitos B

Los LB, al igual que los LT, se originan en la médula ósea a partir de HSC que se diferencian a CLP¹²⁸. A diferencia de los LT, su selección se produce, primero, en la médula ósea y segundo, en los OLS; bazo y linfonodos. Los BCR presentes en la membrana de los LB se reordenan de forma parecida, aunque no idéntica, a los TCR de los LT, consiguiendo también una alta variabilidad. A diferencia de los TCR, los BCR están formados por dos cadenas pesadas idénticas (H), cada una de ellas asociada a una cadena ligera (L), también idénticas entre ellas. Estos dos dímeros H-L se asocian entre ellos mediante puentes disulfuro entre las cadenas pesadas, dando lugar a una estructura especular en forma de Y. Ambas cadenas contienen una región constante y una región variable y, al igual que en los TCR, la región variable es el sitio de unión a antígeno, por lo que un BCR acaba teniendo dos sitios de unión al antígeno. Cada cadena ligera y pesada contiene, en sus regiones variables, las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3.

Existen distintos estadios de desarrollo de las células B que terminan tras el reordenamiento con éxito de sus BCR, pasando a ser LB inmaduros. Los LB inmaduros también sufren una selección negativa para evitar la auto-reactividad¹²⁹ y, si ésta es superada, migran de la médula ósea a los OLS.

Durante la respuesta adaptativa humoral, en los OLS se produce la activación de los LB gracias a la colaboración de las células Th. La activación empieza con la unión de antígenos nativos a los BCR específicos, los cuales son endocitados, degradados y presentados por las moléculas HLA-II a los Th. En los LT capaces de reconocer estos complejos p-MHC mediante sus TCR, se induce la expresión de CD40L en su membrana, molécula coestimuladora que se une a CD40 de la superficie de los LB. La unión de otras moléculas coestimuladoras con sus ligandos, tales como ICOS con ICOSL o OX40 con OX40L (expresados en los LT y LB, respectivamente), también participa en el *cross-talk* celular. Esta unión es necesaria para la proliferación y los procesos que continúan con la diferenciación de los LB.

Algunos de los LB activados empiezan a producir anticuerpos, mayoritariamente del tipo IgM y de baja afinidad, mientras que otros LB pasarán a formar centros germinales. En ellos, y mediante la colaboración de las células Tfh, se producen dos mecanismos de mejora de la afinidad y función de los anticuerpos: la hipermutación somática y el cambio de isotipo. La hipermutación somática, como su nombre indica, consiste en la generación de un alto número de mutaciones somáticas, concretamente en las regiones CDR (zonas de reconocimiento de antígeno). Cada LB empieza a presentar BCR ligeramente diferentes a los de su progenitor y, en un proceso denominado maduración por afinidad, aquellos linfocitos que reconozcan los antígenos con mayor afinidad serán seleccionados. Por otro lado, el cambio de isotipo consiste en la generación de un nuevo BCR que mantiene su región variable pero

recombinada con otra región constante distinta, permitiendo la producción de inmunoglobulinas con otros isotipos diferentes (IgG, IgA, IgD e IgE). La selección de uno u otro isotipo viene determinada por las citocinas secretadas por los Tfh, que acompañan al LB durante el proceso de activación en el centro germinal. Esto asegura la producción de anticuerpos de mayor afinidad y efectividad en la respuesta por parte de los LB, que pasan a diferenciarse en células plasmáticas. Por otro lado, procedentes de esta misma selección, algunos LB no se diferencian a células plasmáticas, sino que se mantienen como LB de memoria, asegurando una respuesta más rápida y de más afinidad en caso de un segundo contacto con el antígeno.

Es por la capacidad de los LB de endocitar antígenos mediante su BCR, procesarlos y presentarlos a través de sus moléculas de MHC-II, que son considerados APC. Además, la señalización producida por la unión de un antígeno a un BCR favorece el procesamiento, incrementando su función como célula presentadora¹³⁰.

II.3. El sistema MHC

Se conoce como MHC, o HLA en humanos, un grupo (*cluster*) de genes que codifican las moléculas HLA-I y HLA-II, así como otras proteínas que participan en el procesamiento de antígeno y en la respuesta inmunitaria innata y adaptativa.

Los loci de HLA se encuentran en el brazo corto del cromosoma 6 humano¹³¹. Éstos pueden agruparse en tres regiones conocidas como región de clase I, región de clase II y región de clase III¹³². En todas ellas se encuentran loci conocidos como clásicos y no clásicos; los primeros codifican para las moléculas HLA de presentación antigénica y el resto para otras moléculas HLA. En la región de clase I se encuentran los loci HLA de clase I clásicos, que incluyen HLA-A, -B y -C, así como los no clásicos que incluyen HLA-E, -F y -G. En la región de clase II se encuentran los genes que codifican para las cadenas α y β de las moléculas HLA de clase II clásicas, HLA-DP, -DQ y -DR, y HLA de clase II no clásicas, HLA-DM y -DO. En la región de clase III no se encuentra ningún gen HLA clásico o no clásico, pero se encuentran genes codificantes de proteínas del complemento y de algunas citocinas.

II.3.1. Características del sistema HLA

El sistema HLA es poligénico y polimórfico, es decir, contiene varios genes distintos y existen múltiples variantes o alelos, respectivamente. De hecho, es el sistema genético más polimórfico de todo el genoma humano¹³³⁻¹³⁵. El polimorfismo del HLA se centra en la región de unión al antígeno, determinando el peptidoma de cada individuo. Esto permite una alta diversidad poblacional que incrementa las probabilidades de supervivencia.

La gran variabilidad del HLA viene dada por varios mecanismos: la selección balanceadora, el desequilibrio del ligamiento y la paralogía. La selección balanceadora

es un tipo de selección natural definida por un mantenimiento de una cierta diversidad genética en la población y explicaría la razón por la cual se han mantenido las variantes alélicas en la población. El desequilibrio del ligamiento es la asociación alélica observada en una región génica determinada. Algunos loci de HLA se presentan juntos de una forma más frecuente de la que se esperaría por azar, por ello se habla de haplotipos de HLA que se heredan en bloque. La paralogía es la existencia de ciertos genes o regiones, llamados parálogos, generados por duplicación¹³⁵. En el genoma humano se encuentran regiones parálogas del HLA en los cromosomas 1, 9 y 19, así como dentro del mismo HLA¹³⁵. Esta característica en el sistema HLA habría contribuido a su alta diversidad.

Por último, las moléculas de HLA se expresan de forma codominante, es decir, se expresan las dos copias – heredados del padre y de la madre – conjuntamente. Cada individuo expresa seis moléculas de HLA de clase I clásicas (cada pareja de HLA-A, -B y -C) y seis moléculas de HLA de clase II clásicas (los pares HLA-DP, -DQ y -DR). Las cadenas β de las moléculas HLA-DR están codificadas por los genes DRB1 (presentes en todos los individuos), y ciertos alelos se encuentran en desequilibrio de ligamiento con los genes parálogos DRB3, DRB4 y DRB5, generando los haplotipos DR52, DR53 y DR51. Es decir, algunos individuos presentan haplotipos en los que se generan dos moléculas HLA-DR de un mismo juego cromosómico. Estas dos moléculas están formadas por una misma cadena α pero contienen cadenas β distintas; una codificada en DRB1 y otra codificada en DRB3, DRB4 o DRB5^{132,136}.

II.3.2. Estructura de las moléculas HLA-I y HLA-II

Ambas moléculas HLA de clase I y clase II son heterodiméricas, aunque con estructuras distintas.

Las moléculas de clase I están formadas por: una cadena α con los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ que, conjuntamente, forman el surco de unión al péptido y un dominio $\alpha 3$ (de la familia de las Ig); una región transmembrana y una cola citoplasmática. Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ son los más polimórficos y el dominio $\alpha 3$ interacciona con CD8 presente en los CTL. Además, asociado a la cadena α , se encuentra la $\beta 2$ -microglobulina, la cual no es polimórfica y se codifica fuera de la región del HLA.

Las moléculas clase II están compuestas por una cadena α y una cadena β , cada una de ellas formada por dos dominios, así como por la región transmembrana y la cola citoplasmática. Los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ forman el surco de unión al péptido, mientras que los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ son los más próximos a la membrana, siendo $\beta 2$ el dominio que interacciona con CD4. Ambas cadenas están ancladas en la membrana mediante una región de 20-25aa y una cola polipeptídica corta.

III.3.3. Biosíntesis de las moléculas del HLA y presentación antigénica

Las moléculas de MHC requieren la unión de un péptido para adquirir la estabilidad estructural y poder realizar la exocitosis hacia la membrana plasmática, de forma que el péptido queda expuesto al exterior celular. El procesamiento y la presentación de antígeno ocurre en condiciones normales por defecto y, en este caso, los péptidos presentados derivan de proteínas propias. En caso de infección u otras condiciones adversas, las APC capturan, procesan y presentan antígenos, en forma de péptidos, desplazando el peptidoma⁽²⁾ propio. Los antígenos son presentados por moléculas HLA-I o HLA-II en función de su origen, i. e., procesados en el citosol o en la vía endocítica, respectivamente¹³⁷.

La vía de clase I es la ruta de biosíntesis de las moléculas HLA-I y la presentación de antígenos presentes en el citosol (Figura 4A). En el retículo endoplasmático (RE), la cadena pesada de las moléculas HLA-I es plegada por la acción de la chaperona calnexina y, posteriormente, se une a la subunidad $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2m$). El heterodímero vacío – sin péptido – es un complejo inestable el cual es reclutado por la chaperona calreticulina (CRT)¹³⁷ al complejo de carga de péptidos (PLC, del inglés *peptide loading complex*), quedando transicionalmente estabilizado. Este complejo está formado por la CRT, la tapasina, la proteína transportadora TAP (del inglés, *transporter associated with antigen processing*)¹³⁸ y la proteína Erp57¹³⁹. La CRT recluta la molécula HLA-I que queda estabilizada en el PLC. Los péptidos citosólicos son degradados por el proteasoma, complejo proteolítico que se encuentra en el citoplasma celular^{140,141}, y posteriormente translocados al RE mediante TAP (formada por las subunidades TAP1 y TAP2) donde los péptidos con afinidad, podrán unirse al surco de unión de la molécula HLA-I. Otras dos proteínas aminopeptidasas conocidas como ERAAP/ERAP1 y ERAP2 ayudan al acortamiento de los péptidos generados por el proteasoma, mayoritariamente mayores al tamaño adecuado para la unión con las moléculas MHC-I. Además, el proceso llamado edición del repertorio peptídico – y que es, en la vía citosólica, dependiente de tapasina – elimina los péptidos de baja afinidad de las moléculas HLA-I. Cuando estas se unen a péptidos de alta afinidad, el complejo p-MHC-I pasa a ser estable, se disocia de CRT y es transportado del RE a la membrana, mediante el aparato de Golgi¹³⁷.

La vía endocítica, por el contrario, es la ruta de biosíntesis de las moléculas HLA-II y de presentación antigénica de péptidos extracelulares (Figura 4B). Las moléculas HLA-II también son ensambladas en el RE, pero son cargadas en los endosomas tardíos, ricos en péptidos procedentes de proteínas fagocitadas, pinocitadas,

² El peptidoma es el conjunto de péptidos presentados por una célula a través de sus moléculas MHC.

endocitadas o autofagocitadas las cuales han sido proteolizadas por acción de las catepsinas. Las cadenas α y β de las moléculas de HLA-II se asocian a la cadena invariante (Ii) o CD74, una chaperona específica encargada del plegamiento y ensamblaje de HLA-II que evita la carga de péptidos en el RE. Gracias a esta unión con Ii, las moléculas HLA-II son dirigidas a los compartimentos endosomales, donde empieza la proteólisis de Ii, restando solamente la porción que bloquea el sitio de unión de HLA-II, denominado CLIP. CLIP no es liberado de las moléculas MHC-II hasta que éstas se unen a otra glicoproteína; HLA-DM (DM). Ésta induce un cambio conformacional en las moléculas HLA-II dejando el sitio de unión libre por la liberación de CLIP. Dado que DM tiene la capacidad de eliminar péptidos de baja afinidad de las moléculas HLA-II, en la vía endocítica es la encargada de la edición del repertorio peptídico, de forma similar a la tapasina en clase I. DM es, a su vez, regulada por otra proteína llamada HLA-DO (DO)¹⁴². DO tiene la capacidad de unirse a DM por el mismo sitio de unión que DR, secuestrando a DM y evitando el intercambio de péptidos en MHC-II^{143,144}. La implicación de la expresión de DO ha sido, sobre todo, estudiada en LB^{145,146}, ya que son las únicas células con expresión de esta proteína, juntamente con las células del epitelio tímico¹⁴². En LB se ha demostrado que una baja expresión de DO está asociada a una mayor presentación de p-MHC, mientras que cuando esta proteína es altamente expresada, se encuentra una mayor expresión de HLA-II unida a CLIP en membrana¹⁴⁶, limitando la presentación antigénica.

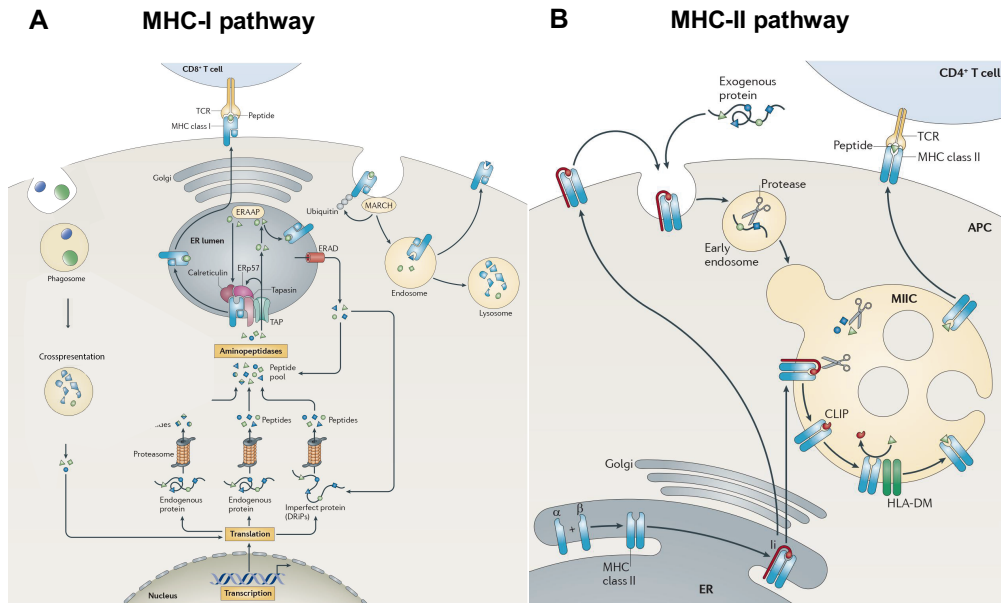


Figura 4. Vías de presentación antigénica y biosíntesis de las moléculas de MHC-I y MHC-II. (A) Vía de presentación de clase I. Los péptidos degradados por el proteasoma son transportados por TAP al RE, donde el MHC-I ha sido previamente reclutado por la calreticulina al complejo de carga de péptidos. ERAAP realiza un acortamiento de los péptidos, los cuales se unen al MHC-I, que queda estabilizado y es transportado a la membrana a través del aparato de Golgi, donde puede ser reconocido por los TCR de los LT CD8+. Las células dendríticas también tienen capacidad de trasladar antígenos fagocitados al citosol, los cuales pueden ser presentados por la vía de MHC-I, conocido como *cross-presentation*, o presentación cruzada. (B) Vía de presentación de clase II. Las moléculas MHC-II ensambladas en el RE se asocian a la cadena invariante (Ii) la cual evita la carga de péptidos en el RE. Los complejos Ii-MHC-II son dirigidos a los endosomas tardíos, donde Ii empieza a ser proteolizado, restando solamente CLIP, el péptido protector del surco de unión del MHC-II. Posteriormente, se asocia a HLA-DM, liberando CLIP y dejando el sitio de unión libre. Los péptidos previamente proteolizados por las catepsinas, procedentes de la fagocitosis, endocitosis o pinocitosis, pueden unirse a las moléculas HLA-II, las cuales serán dirigidas a la membrana. Los complejos p-MHC-II podrán ser reconocidos por los TCR de los LT CD4+. (A) Adaptado de J. Neefjes, M. L. M. Jongsma, P. Paul y O. Bakke¹⁴⁷.

III. Inmunología del cáncer

Entre las distintas funciones del sistema inmune se encuentra la identificación y eliminación de tumores, conocido como *vigilancia inmune* o, en inglés, *immune surveillance*. Durante los estadios iniciales del desarrollo de un tumor, y si se genera suficiente cantidad de antígenos que puedan ser procesados y presentados por las APC que migren a los linfonodos cercanos, los LT naïve pueden ser activados, sufrir expansiones clonales y migrar hacia el tejido tumoral como LT infiltrantes de tumor (T-TIL) para ejercer su función efectora. Por lo tanto, la respuesta anti-tumoral sigue el ciclo clásico de la respuesta adaptativa, aunque es más compleja que en otros

contextos puesto a que la naturaleza autóloga de las células tumorales limita su reconocimiento.

III.1. El microambiente tumoral

El microambiente tumoral se define como el conjunto de células no tumorales, moléculas y vasos sanguíneos que rodean y nutren una célula tumoral, según la definición del National Cancer Institute¹⁴⁸. Éste es variable, puede verse condicionado por el tumor y a la vez condiciona el crecimiento tumoral y su diseminación. Los componentes del microambiente tumoral pueden clasificarse en celulares y no celulares y, a su vez, en componentes del sistema inmune y otros componentes no inmunitarios^{149,150}. Las citocinas, quimiocinas u otro tipo de moléculas producidas por cualquier tipo celular (tumorales, inmunitarias u otras) son un reflejo de los eventos que se están produciendo, a la vez que coordinan y modulan la respuesta.

Respecto a las células que no forman parte del sistema inmune, las más importantes en el desarrollo y evolución del tumor son: las células endoteliales, que juegan un papel importante en la diseminación tumoral y la metástasis; los fibroblastos asociados a tumor y las células madre mesenquimales, la presencia de las cuales está generalmente asociada a un peor pronóstico¹⁵¹. Otros tipos celulares tienen más o menos relevancia en función del tipo de tumor, i. e., los adipocitos juegan un rol importante en el crecimiento tumoral debido a la liberación de ácidos grasos, proporcionando sustrato para la producción de energía o la formación de membranas a las células tumorales. Éstas son especialmente relevantes en el cáncer de mama debido a que el tejido mamario está compuesto en gran parte de tejido adiposo.

Entre los componentes no celulares se encuentran, principalmente, la matriz extracelular y los exosomas¹⁴⁹. La matriz confiere al tumor un soporte donde crecer y es además un depósito de moléculas de señalización. El colágeno, como componente de la matriz extracelular, puede incrementar la desmoplasia, o colagenización del tumor, lo cual resulta en un peor pronóstico¹⁵². Por otra parte, los exosomas – pequeñas microvesículas que contienen proteínas, ácidos nucleicos y lípidos de las células de los que se originan – también son determinantes en el microambiente tumoral, ya que facilitan la comunicación celular entre células tumorales y células del estroma. Se ha descrito que la presencia de exosomas está asociada a la progresión tumoral y metástasis¹⁵³.

Entre las células del sistema inmune pueden encontrarse tanto células de la inmunidad innata como de la adaptativa, ambas con un papel en la vigilancia inmunológica. Las células de la inmunidad innata, juntamente con las células T_{reg}, son las encargadas de iniciar la inmunidad anti-tumoral^{154,155}.

III.1.1. Linfocitos y otras células infiltrantes de tumor

Las células del sistema inmune pueden tener roles supresores o promotores del crecimiento tumoral, principalmente en función de los subtipos celulares y su actividad. Por otro lado, los tumores u otros componentes del microambiente pueden afectar su funcionalidad, y, en consecuencia, la presencia de estas células, incluso cuando realizan funciones anti-tumorales, puede no correlacionarse con un buen pronóstico¹⁵⁰. Por ello, la eficiencia de la respuesta anti-tumoral depende de la inmunogenicidad del tumor y del balance entre señales coestimuladoras e inhibidoras. A pesar de que otros tipos celulares son igualmente importantes en la respuesta anti-tumoral, este trabajo se focaliza en el papel de los T-TIL como células efectoras y de las DC y B-TIL como APC.

En general, un alto infiltrado de LT intratumoral se correlaciona con un buen pronóstico en varios tipos de tumores, como en cáncer de pulmón¹⁵⁶, cáncer de mama¹⁵⁷, melanoma¹⁵⁸, cáncer colorrectal¹⁵⁹ y cáncer ovárico¹⁶⁰, entre otros. Sin embargo, el balance entre subtipos de LT es crucial; la ratio entre CTL/Treg se ha descrito como un marcador pronóstico más preciso que la mera presencia de los LT. Por un lado, las Treg limitan la función efectora no solamente de CTL sino también de NK o de Th y, por otro, un alto infiltrado de CTL, debido a su capacidad citotóxica, se ha relacionado con una mejor respuesta anti-tumoral¹⁶¹⁻¹⁶³.

La presencia de Th1 también ha demostrado ser importante en la respuesta anti-tumoral, ya que, mediante la secreción de citocinas como la IL-2, TNF- α y IFN- γ , promueven la activación de otros subtipos celulares y la presentación de antígenos tumorales^{164,165}. Por el contrario, las células Th2 se consideran, en general, promotoras del crecimiento tumoral¹⁶⁶. Otros tipos celulares, como las Th17, pueden tener un papel dual; por un lado, pueden incrementar el reclutamiento de CTL mediante la secreción de quimiocinas y, por otro, se ha descrito que incrementan la angiogénesis¹⁶⁷.

A pesar de que tanto entre los LB como entre las DC existen subtipos supresores o reguladores de la respuesta (i. e., LB reguladores o Breg y DC tolerogénicas), la presencia de las cuales se relaciona con una mayor progresión tumoral, su función como APC está asociada a una buena respuesta anti-tumoral¹⁶⁸⁻¹⁷¹. Esto es debido al propio incremento de antígenos tumorales presentados, así como a la estimulación de los LT por parte de ambos subtipos. No obstante, una presentación eficiente también dependerá del tipo de antígenos que se originen.

III.1.2 Linfocitos infiltrantes de tumor en cáncer de mama

En el microambiente tumoral del CM se ha estudiado, sobre todo, la presencia de TIL. Anteriormente, el CM se consideraba un cáncer inmunológicamente inactivo, especialmente en comparación con otros tipos de cáncer como el melanoma. Sin

embargo, en los últimos años se ha demostrado claramente la presencia de TIL, y su asociación a un mejor pronóstico.

Todavía no existe un consenso único en cuanto a la asociación entre la presencia de TIL con la evolución tumoral en los distintos subtipos de CM. Algunos estudios han determinado que la presencia de TIL solo es favorable en tumores HER2+ y CMTN¹⁷², mientras que otros autores han reportado que la presencia de TIL mejora la supervivencia en todos los casos, aunque no de forma tan notable en los tumores HER2-, dado que están generalmente menos infiltrados¹⁷³. Estudios distintos han descrito su presencia en todos los tipos de CM⁵⁵ y la han relacionado con un buen pronóstico en todos ellos¹⁶⁵. En resumen, no existen conclusiones claras referentes a la presencia y valor de los TIL, por lo que su investigación en distintos tipos de tumores mamarios sigue siendo necesario.

Existe un mayor consenso respecto a la presencia de tipos celulares con funciones opuestas y su valor pronóstico. Mientras que los subtipos relacionados con una respuesta de tipo Th1 y/o citotóxica se asocia a un pronóstico favorable, los subtipos celulares de respuesta de tipo Th2 y/o reguladora promueven el crecimiento tumoral mediante la desviación a una respuesta anti-inflamatoria¹⁷³⁻¹⁷⁷. La presencia de CTL se ha relacionado con un mejor pronóstico independientemente de otros parámetros clínico-patológicos, en la mayoría de tipos de CM^{175,178-181}. Por el contrario, la presencia de Treg se ha asociado a una peor evolución de la enfermedad^{160,182-187}, especialmente en tumores HR+^{173,188,189}. Sin embargo, su presencia a veces se ha asociado a mejores pronósticos o a una mejor respuesta al tratamiento, aunque más que su propia presencia lo que indica es un alto infiltrado, lo cual se asociaría a una mejor evolución. Por ello, es más útil el estudio de las ratios CTL/Treg, dado que su valor pronóstico tiene más significancia^{172,190-192}. Por último, es difícil asociar la presencia de células Th17 a un mejor o un peor pronóstico, ya que poseen una gran plasticidad. En algunos casos, una alta proporción de Th17 se asocia a un pronóstico poco favorable, aunque en otros puedan ejecutar una función anti-tumoral^{193,194}.

Entre el infiltrado se han descrito LB en todos sus estadios de diferenciación, aunque mayoritariamente abundan los LB de memoria¹⁹⁵. A pesar de que han sido menos investigados, su importancia es reconocida y su presencia se asocia a una mejor o peor respuesta en base al subtipo¹⁷⁵. Los LB tienen funciones activadoras de la respuesta tipo 1, pero la presencia de Breg, supresoras de la activación, se ha asociado a una supervivencia disminuida. La coexistencia de Breg y Treg empeora más el pronóstico¹⁹⁶. En cuanto a su relevancia en los distintos tipos de tumores, se ha asociado, sobre todo, a una mejor evolución en CM HER2+ y TN^{195,197}. En los últimos años, ha surgido un creciente interés por las células Tfh, altamente asociadas a la formación de estructuras linfoides terciarias (TLS, del inglés *tertiary lymphoid structure*). Las TLS se forman en respuestas inmunes mantenidas en el tiempo y/o

crónicas, tales como la autoinmunidad. En cáncer, se ha descrito que la presencia de Tfh productoras de CXCL-13 contribuyen a la formación de TLS, con un papel importante en el reclutamiento celular¹⁹⁸ y de mejora de la respuesta.

Aunque menos investigados, el papel de otros subtipos celulares en el CM, tales como de DC y NK, también ha sido reconocido. Pese a que el conocimiento sobre la función de DC en CM es limitado, su importancia está determinada por su capacidad de *cross-talk* con otros subtipos celulares y su asociación favorable a su presencia como APC en otros tipos de tumores. La presencia de NK – con un papel relevante en la respuesta anti-tumoral – depende del subtipo de NK encontrado y de su estado de activación. Su potencial pronóstico y predictivo se ha descrito en CM HER2+ y TN. En estado activado se ha asociado con una mayor supervivencia en CM HER2+, mientras que en estado de reposo se relacionan con un mal pronóstico tanto en tumores HER2+ como TN¹⁹⁹.

III.2. Respuesta frente a antígenos tumorales

La mayoría de los antígenos resultantes de la destrucción o apoptosis de las células tumorales son antígenos propios, ante los cuales los LT teóricamente se mantienen tolerantes. Sin embargo, ciertas diferencias entre los tejidos normales y los tejidos tumorales, por su naturaleza, pueden favorecer el reconocimiento por parte de los LT. Los clones de LT que migren al tumor deben encontrar células tumorales presentando antígenos para poder reconocerlas y eliminarlas. Puesto que las células epiteliales generalmente no expresan moléculas HLA-II, solamente pueden ser directamente reconocidas por los LT CD8+. Por lo tanto, el mantenimiento de los LT CD4+ depende de la presencia de APC en el sitio del tumor. Aunque las células CD4+ generalmente no tienen una función citotóxica, su papel en cáncer ha sido recientemente reconsiderado, dado que son necesarias para una correcta activación de la respuesta y para el mantenimiento de la memoria inmunológica²⁰⁰. Además de esto, ciertos tumores poseen la capacidad de decrementar la expresión de HLA-I, siendo aún más necesaria la presencia de APC para el mantenimiento de LT CD8+.

Considerando que la respuesta T depende del reconocimiento antigénico, el tipo de antígenos tumorales expresados o presentados por las células cancerosas puede moldear el repertorio observado. Los antígenos tumorales pueden dividirse en antígenos asociados a tumor (TAA, del inglés *tumor-associated antigens*) y antígenos específicos de tumor (TSA, del inglés *tumor-specific antigens*), respectivamente.

III.2.1. Antígenos asociados a tumor

Los TAA han sido ampliamente estudiados como candidatos para inmunoterapia. Estos derivan de proteínas propias y pueden categorizarse en antígenos de línea germinal, antígenos diferenciales y antígenos sobreexpresados^{201,202}.

Los antígenos de línea germinal derivan de proteínas que se expresan de forma natural durante el desarrollo fetal, así como en ciertos tipos de tumores, pero los cuáles por lo general no se expresan en tejidos adultos normales. Los antígenos de línea germinal más investigados son los antígenos NY-ESO-1 y MAGE-A, reportados por primera vez en pacientes con sarcoma de células sinoviales y melanoma^{203–208}, aunque también han sido descritos en varios otros tipos de tumores^{205,209–220}. Los antígenos diferenciales son proteínas específicas del tejido o de las células, tanto sanas como afectadas, donde se está produciendo el tumor, pero que no se expresan en otros tejidos, e. g., CD19 en la mayoría de los linfomas de células B^{84,202} o gp100 y MART-1 en melanoma^{221,222}. Los antígenos sobreexpresados son proteínas que se encuentran en varios tejidos pero que están altamente expresados en el tumor, como HER2 en cáncer de mama y ovario^{223,224}.

La principal ventaja de los TAA como diana es que son compartidos entre individuos, por lo que no se requieren tratamientos individualizados⁽³⁾. Sin embargo, el reconocimiento de moléculas propias puede llevar a toxicidades debido a la muerte celular de otras células sanas que puedan expresarlas. Dichas toxicidades pueden variar desde una pérdida temporal de las células diana hasta la destrucción permanente de ciertos tejidos^{202,225}. Por otra parte, debido a la selección tímica, la afinidad de unión de los TCR a los complejos de péptidos propios-MHC es mucho menor que la afinidad con la que reconocen péptidos no propios²²⁶. No obstante, la liberación de antígenos propios en altas concentraciones puede originar una respuesta de alta dosis/baja afinidad, comprometiendo la tolerancia periférica y que puede desencadenar reacciones autoinmunes²²⁷.

III.2.2. Antígenos específicos de tumor

En la década de los 50, Prehn et al.²²⁸ propusieron que mutaciones no sinónimas en el ADN podrían codificar proteínas mutadas expresadas por los tumores. Posteriormente, se planteó la hipótesis de que estas proteínas podrían generar diferentes péptidos capaces de activar células T específicas. Estos péptidos propios mutados también son conocidos como neoantígenos y, gracias a los avances en las tecnologías de secuenciación, son probablemente los candidatos más populares como *target* para atacar a las células tumorales. Los neoantígenos son TSA, ya que solo se expresan en tejidos tumorales. Entre los TSA también se encuentran los antígenos virales, los cuales se expresan y presentan en células cancerosas de origen oncoviral²²⁹.

³ Se hace distinción entre tratamiento personalizado e individualizado. Se considera un tratamiento personalizado aquel que puede administrarse a varios pacientes con un perfil común, e. g., anti-HER2 en CM HER2+, mientras que el tratamiento individualizado se genera específicamente para un paciente, e. g., ACT de T-TIL o mediante terapias basadas en la respuesta contra neoantígenos.

Introducción

A diferencia de los TAA, los neoantígenos son individuales y específicos, puesto que las mutaciones ocurren aleatoriamente, limitando el uso generalizado de tratamientos. Usar los TSA como diana es supuestamente más seguro, ya que estos antígenos no deberían ser presentados por células y tejidos normales²⁰².

El haplotipo de HLA del individuo restringe la presentación antigénica, y cada HLA puede presentar péptidos con un determinado motivo de secuencia. Una mutación en la secuencia de ADN no implica directamente una presentación de la correspondiente secuencia aminoacídica. Al mismo tiempo, no todas las mutaciones, por sí mismas, implican la generación de péptidos con mayor afinidad por las moléculas de HLA. La pérdida de distintos aminoácidos en algunas posiciones podría incluso producir el efecto contrario, ya que ciertos bolsillos del HLA están altamente restringidos a aminoácidos específicos^{134,230}. Además, se requeriría de una gran abundancia de la proteína generadora del neoantígeno para ocupar una parte relevante del peptidoma presentado y su expresión debería mantenerse en el tiempo para orquestrar una buena respuesta inmune. Por lo tanto, el número de neoantígenos presentados por las moléculas de HLA probablemente está menos favorecido comparado con el de los TAA, ya que estos últimos se expresan alta o constitutivamente en los tumores. Todo ello implica que la búsqueda de neoantígenos por secuenciación del exoma completo debe ir acompañada de estudios sobre su expresión en el tiempo y si son procesados y presentados por las APC, considerando la restricción de HLA del individuo.

III.3. Inmunoedición del cáncer

La inmunoedición del cáncer es un proceso dinámico en el cual el sistema inmunitario puede reconocer y eliminar las células tumorales, pero a su vez puede promover su crecimiento^{231–233}. Este proceso ocurre en tres fases: la eliminación, el equilibrio y el escape tumoral. En la fase de eliminación, los mecanismos de vigilancia inmunológica, tanto innata como adaptativa, reconocen y eliminan las células tumorales. Sin embargo, si la eliminación no es completa, las células tumorales pueden entrar a una fase de equilibrio, en la cual el crecimiento es limitado y editado por la inmunidad adaptativa. Algunas de estas células empiezan a desarrollar nuevas variantes y, mediante un mecanismo de presión selectiva, aquellas que no sean reconocidas o hayan desarrollado mecanismos inmunosupresores pueden sobrevivir y crecer descontroladamente, dando lugar a tumores malignos, clínicamente visibles. Este último proceso es la fase de escape inmunológico.

III.3.1. Mecanismos de escape

Durante las fases de equilibrio y escape, se pueden producir múltiples mecanismos a través de los cuales las células tumorales eluden el reconocimiento inmunitario o inhiben sus funciones. Entre ellos destacan la inducción de formación de barreras físicas, la pérdida de inmunogenicidad, la propia tolerancia a los antígenos propios, la

modulación antigénica y el favorecimiento de un ambiente inmunosupresor de la respuesta a través de moléculas coestimuladoras (como IC) o citocinas. Por presión selectiva, aquellas células que eviten el reconocimiento serán las que sobrevivirán, permitiendo el crecimiento tumoral. La pérdida de la expresión de antígenos tumorales provoca que aquellas células que presenten antígenos diana sean eliminadas, mientras que en aquellas variantes en las que el antígeno inmunodominante se pierda, dejarán de ser reconocibles por el sistema inmune, escapando de la respuesta.

De forma parecida, la pérdida de la inmunogenicidad está relacionada con anomalías en la expresión de las moléculas HLA-I, descrito en una gran cantidad de tumores humanos. Las células tumorales que pierden esta expresión no pueden ser reconocidas por los LT CD8+. Los procesos a través de los cuales se produce la pérdida de la expresión de estas moléculas son variados, des de mecanismos epigenéticos a mutaciones e incluso deleciones somáticas del haplotipo. Es importante remarcar que las moléculas HLA-I actúan como ligando de receptores inhibidores de las NK. Cuando la expresión de HLA-I se ve reducida, los receptores inhibidores dejan de tener su ligando unido, de modo que las NK pueden activarse y mediar una respuesta citotóxica²³⁴.

Por otra parte, el microambiente tumoral, tal y como se ha descrito anteriormente, es definitorio y crucial en la progresión del tumor. Distintos tipos celulares y citocinas inducen a un ambiente supresor que limita la función de la respuesta anti-tumoral. Existen muchos tipos de regulación de la respuesta inmunitaria que, en condiciones normales, tienen la función de terminar la respuesta o forman parte de los mecanismos de tolerancia periférica. Sin embargo, estos mecanismos en el microambiente tumoral se asocian al escape. Entre las células que contribuyen a este escape se encuentran los macrófagos asociados a tumor de tipo M2 – que, a diferencia de los M1 actúan como supresores – los fibroblastos asociados a tumor, las células Breg, las células Treg o las DC tolerogénicas. Asimismo, la polarización a un fenotipo Th2 también contribuye a una supresión de la respuesta. Muchos de estos mecanismos, aunque no todos, vienen mediados por factores secretados en el microambiente. Entre las citocinas más comúnmente asociadas a la supresión se encuentran el TGF- β (del inglés, *transforming growth factor- β*) y la IL-10, las cuales disminuyen la capacidad de presentación de antígeno. Por otro lado, las células tumorales pueden producir la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO), la cual promueve la diferenciación de LT a un fenotipo de Treg. Mediante la depleción del triptófano por su metabolización por parte de IDO y la acumulación de quinurenina como producto resultante, puede producir la muerte de los LT²³⁵.

Otro de los principales mecanismos de inhibición de la respuesta se produce a través de receptores de inhibición, o IC del sistema inmunitario. Los dos mejor conocidos

son PD-1 y CTLA-4. A pesar de que ambos receptores tienen una función de bloqueo de la respuesta, sus mecanismos de acción son distintos.

El receptor CTLA-4 se expresa en prácticamente todos los LT tras su activación y compete con el receptor coestimulador CD28 para sus ligandos CD80 y CD86^{44,236}. CTLA-4 tiene mayor afinidad por estos ligandos, pero a diferencia de CD28, no se expresa de forma constitutiva, excepto en los Treg²³⁷. Su expresión se regula rápidamente tras la interacción del TCR con el complejo p-MHC, mandando señales de terminación de la activación a los LT para evitar una respuesta exacerbada. En ratones CTLA-4 *knockout* (KO) se desarrolla una hiperactivación sistémica del sistema inmunitario⁴⁵, demostrando su papel crítico en la restricción de la respuesta y el mantenimiento de la homeostasis.

Por otro lado, PD-1 también se expresa en LT activados, aunque no de forma inmediata tras su activación. PD-1 interacciona con sus ligandos PD-L1 o PD-L2 que pueden expresarse en las membranas de las APC, así como de otras células, entre ellas las tumorales. La función de PD-1 es evitar una respuesta producida por una exposición persistente o crónica a antígenos²³⁸, la cual podría llegar a romper la tolerancia periférica. En el contexto tumoral también se produce esta exposición persistente de antígenos, por lo que a menudo se induce la expresión de PD-1 en los LT, que los deriva a un fenotipo exhausto.

III.4. El repertorio de TCR en cáncer

Debido a la especificidad de antígeno de las células T proporcionada por el TCR, éste representa un biomarcador de pronóstico prometedor. La diversidad es una de las características más estudiadas del repertorio de TCR, ya que refleja el número de clonotipos diferentes y su abundancia, es decir, la diversidad puede dar información sobre los T-TIL que experimentan expansiones clonales, lo cual indica activación y respuesta de células T. El repertorio de TCR es el reflejo de los procesos que le han dado forma. Sin embargo, aún no está claro cómo debe configurarse en pacientes con cáncer para un mejor pronóstico de la enfermedad o una mejor respuesta a los tratamientos. Los cambios en el repertorio pueden ser monitorizados mediante secuenciación de alto rendimiento (HTS, del inglés *big-throughput sequencing*) del TCR, que ya es considerado una herramienta para mejorar la comprensión de las respuestas de las células T en muchos contextos ²³⁹.

La existencia de determinados péptidos que pudieran desencadenar una respuesta antitumoral implicaría la expansión de LT. Sin embargo, puede verse limitada por varios factores: (i) la presencia de APC; (ii) la exposición al antígeno tumoral a lo largo del tiempo; (iii) la restricción por el HLA de los individuos, que a su vez implica cierta restricción clonal y (iv) el estado del repertorio TCR de los pacientes en el momento de la enfermedad. Varios estudios han evaluado el papel del repertorio en pacientes

con cáncer. Mientras que en los estudios realizados con sangre periférica se observan conclusiones opuestas, en los estudios de repertorio intra-tumoral los datos son más concordantes.

En estudios periféricos, algunos autores han reportado que una alta diversidad es un factor positivo. En concreto, una alta diversidad se ha asociado a una mayor supervivencia libre de progresión en melanoma²⁴⁰ y a un riesgo menor de muerte temprana en cáncer de mama²⁴¹. También se ha descrito que la diversidad disminuye cuando la carcinogénesis progresa en pacientes con cáncer de cérvix²⁴². Por el contrario, otros estudios han descrito una mayor diversidad en pacientes con cáncer nasofaríngeo respecto a individuos sanos²⁴³, o – en un estudio con pacientes con cáncer de páncreas – no se encontraron diferencias²⁴⁴. El uso de muestras de sangre periférica para estudiar el repertorio de TCR puede resultar atractivo dada su facilidad de obtención; sin embargo, los repertorios de TCR intratumorales y periféricos son distintos,^{244–247} pudiendo sesgar los resultados. En particular, en los repertorios periféricos, la abundancia de linfocitos específicos de tumor puede diluirse y la diversidad de TCR puede verse afectada por otros factores como la edad, la exposición a otros antígenos o procesos de inmunosupresión subyacentes.

Teniendo esto en cuenta, el análisis del repertorio de TCR en el sitio del tumor puede proporcionar información más detallada sobre la respuesta inmune. En este caso, la gran mayoría de estudios que han asociado la diversidad intratumoral han llegado a conclusiones similares que indican que niveles más bajos de diversidad se asocian con un peor pronóstico^{243,248,249}. En algunos estudios se ha comprobado que una disminución en el número de clones diferentes, provocando una disminución en la diversidad de TCR, también provoca que los repertorios de TCR en tejidos sanos y tumorales se vuelvan más diferentes cuando la enfermedad empeora^{243,250,249}. Esto puede indicar que los cambios en las células malignas provocan una adaptación de la respuesta T y, en consecuencia, una modificación en el repertorio de TCR. En general, en individuos sanos, así como en tejidos sanos de pacientes con cáncer, se observa una mayor diversidad y, en concordancia, también se ha detectado en pacientes con una mejor progresión de la enfermedad. Se ha propuesto que una mayor diversidad de TCR indica un sistema inmunológico funcional con una mejor capacidad para orquestar una respuesta antitumoral. La pérdida de diversidad también puede ser consecuencia de un tumor agresivo, lo que lleva a un fallo del sistema inmunitario.

Por último, el repertorio de TCR también se está estudiando como biomarcador de respuesta a tratamientos con ICI. A pesar de que este tipo de tratamientos son usados para tratar varios tipos de tumores²⁵¹, su éxito no es generalizado entre pacientes y, menos aún, entre distintos tipos de cáncer. Además, el uso de ICI, u otros tratamientos relacionados con el sistema inmunológico, implica su alteración directa, y los nuevos tratamientos provocan eventos no deseados, también conocidos como

eventos adversos relacionados con el sistema inmunológico (irAE, del inglés *immune related adverse events*). Como efecto secundario de esta activación, los irAE son respuestas de tipo autoinmune que pueden ocurrir en cualquier órgano o sistema²⁵²⁻²⁵⁴. Tanto la respuesta a ICI como los irAE están dirigidos por el sistema inmunitario, con un papel fundamental de los LT. Por extensión, el TCR se ha convertido en uno de los mejores candidatos a ser un biomarcador predictivo de respuesta a ICI y de desarrollo de irAE.

III.4.1. Factores determinantes del repertorio de TCR

La gran variabilidad del TCR viene además determinada por distintos factores que lo influyen de forma diferencial en cada individuo o tipo de tumor, e. g., los pacientes con melanoma presentan una mayor clonalidad en comparación con los pacientes con linfoma de células B²⁴⁸. Por ello, los datos que surgen de distintos tipos de tumores no siempre son comparables y varios factores especialmente relevantes en la determinación del repertorio explican los datos contradictorios si se comparan trabajos realizados en distintos tipos de tumor. Los factores que determinan el repertorio de TCR en el contexto tumoral se han resumido en la Figura 5,

El nivel infiltrante de tumor por parte de las células inmunitarias y la carga de mutación tumoral (TMB, del inglés *tumor mutational burden*) están estrechamente ligados y a la vez son dos de los elementos especialmente influenciadores en el repertorio. Anteriormente ya ha sido propuesto que los tumores se pueden clasificar de acuerdo con estos dos parámetros²⁵⁵, y algunos estudios los incluyen entre los factores para identificar diferencias estadísticamente significativas para predecir el pronóstico y la progresión del cáncer²⁵⁶⁻²⁵⁹.

Diferentes niveles de infiltración pueden deberse a las diferencias intrínsecas entre tejidos. Recientemente, Marderstein et al.²⁶⁰ realizó un estudio exhaustivo sobre la infiltración de las células inmunitarias comparando diferentes tejidos e individuos. En este estudio se concluyó que los tejidos cancerosos no solamente pueden dividirse en fríos y calientes (*hot and cold tumors*) por su nivel de infiltrado, sino también por su composición celular. El grupo de Marderstein realizó un agrupamiento jerárquico de tejidos en función de la cantidad de 14 tipos distintos de células, tanto de la inmunidad innata como adaptativa. Se observó que ciertos tejidos en todo el cuerpo se agrupan estrechamente (como piel, subtejidos gastroesofágicos y cerebrales). Al mismo tiempo, otros tejidos que forman parte del mismo sistema no se agrupan en los mismos *clusters*, p. ej. los tejidos del colon transversal, el colon sigmoide y el intestino delgado presentaron infiltrados inmunes muy diferentes, especialmente en el contenido de LT. Otros tejidos, como los pulmones, están altamente infiltrados por macrófagos, que en el microambiente tumoral se sabe que pueden tener un doble rol: pueden fagocitar células cancerosas o actuar como reclutadores de LT, y al mismo tiempo pueden inducir la angiogénesis y promover la invasión tumoral^{261,262}. Todas

estas diferencias intrínsecas a los tejidos deben considerarse en los estudios en cáncer, ya que diferentes niveles de infiltrado basal de diferentes poblaciones inmunitarias orquestarán respuestas antitumorales distintas y/o su abundancia repercute en el análisis de la diversidad^{263,264}, e. g., los T_{rm} – naturalmente presentes en tejidos en condiciones sanas – presentan generalmente un repertorio más clonal, por lo que afectan a la medida de la diversidad. Además, diferentes individuos pueden tener niveles de infiltración muy diferentes, por lo que la disparidad de conclusiones en los estudios de repertorio de TCR también puede deberse a estas variaciones.

Por otro lado, la TMB puede ser un condicionante clave del repertorio de TCR y puede explicar por qué se observan niveles de clonalidad distintos en los tumores en comparación con los tejidos no afectados en algunos estudios. Una mayor tasa mutacional aumenta la probabilidad de generación de neoantígenos y, por consiguiente, la probabilidad de que entre ellos se encuentren péptidos de mayor afinidad por las moléculas de HLA. Esto influye en el número de expansiones clonales, ya que también aumentan las posibilidades de que los LT reconozcan algunos péptidos. Como se ha comentado anteriormente, la pérdida de diversidad de TCR se ha asociado en múltiples estudios a un peor pronóstico. Al mismo tiempo, los tumores con un TMB elevado son más agresivos y se asocian a más expansiones clonales. Dado que una mayor clonalidad no se traduce en una mejora de la condición de los pacientes, surge la pregunta de si los clonotipos expandidos reconocen las células diana. Se ha demostrado en pacientes con melanoma que los clones presentes en frecuencias más altas pueden reconocer neoantígenos y TAA²⁶⁵, pero además, que los clones más expandidos y reactivos de tumor expresan PD-1²⁶⁶, por lo que la alta clonalidad no sería directamente la causa del mal pronóstico, sino la naturaleza agresiva de los tumores en los que se generan más mutaciones y el estado exhausto de los LT que los reconocen. En línea con estos hallazgos, varios estudios han demostrado que los pacientes con mayor clonalidad son los que mejor responden al tratamiento anti-PD-1^{267,268}. Además, ciertos tumores (como tumores colorrectales) con deficiencia en el *mismatch repair* (reparación de ADN)– fuertemente asociados con la inestabilidad de microsatélites – y los cuales presentan TMB muy altas, están asociados con una infiltración inmune alta y mejores respuestas a tratamientos con

Introducción

ICI^{269–279}. Esto refuerza la idea de que un TMB alto genera más neoantígenos que incrementan la infiltración y activación de T-TIL específicos del tumor.

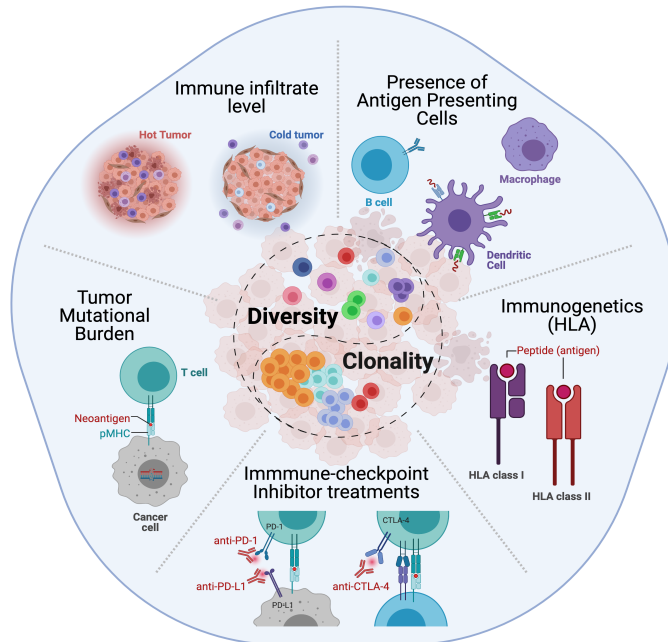


Figura 5. Factores relacionados con el sistema inmune condicionantes del repertorio de TCR en cáncer. Cinco factores principales pueden afectar la diversidad, o clonalidad, del TCR en cáncer: (i) el grado de infiltración de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL); (ii) la presencia de células presentadoras de antígeno capaces de mantener una respuesta asociada a tumor; (iii) la inmunogenética del individuo, i. e., el HLA; (iv) los tratamientos con inhibidores de puntos de control (ICI) que pueden afectar a la activación o reactivación de las células T; y (v) la carga mutacional que condiciona el número de neoantígenos que pueden producirse y presentarse. Creada con Biorender.com.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

Existen pocos estudios sobre las características del infiltrado en CM, así como sobre las diferencias entre subtipos celulares de T-TIL en distintos tipos de tumores mamarios. Sin embargo, está bien establecido que una ratio CD8+/Treg alta está correlacionada con un mejor pronóstico. Por otro lado, el análisis del repertorio de TCR como biomarcador está adquiriendo relevancia, dado que, de manera indirecta a través de la observación de expansiones clonales, puede indicar reconocimiento específico de antígeno. Debido a que los LT CD4+ y CD8+ reconocen complejos p-MHC distintos (MHC-II y MHC-I, respectivamente) los TCR que presentan podrían también diferenciarse por ciertas propiedades fisicoquímicas. Por ello, la secuenciación del TCR tiene el potencial de aportar información sobre el estado de la respuesta *in situ* y en distintos subtipos celulares. Las diferencias entre los antígenos que reconocen uno y otro subtipo de LT también pueden influenciar el repertorio: por un lado, los LT CD4+ reconocen péptidos que han sido procesados en la vía endocítica y que son captados del exterior; por otro lado, los LT CD8+ reconocen péptidos del interior de la célula, generalmente endógenos. Además, la restricción alélica del HLA condiciona el peptidoma y, por lo tanto, influye a su vez en el repertorio de TCR. Por ello, es importante entender cómo distintos alelos presentan una misma fuente de antígenos para determinar cómo podrían afectar al repertorio de TCR encontrado en un infiltrado intra-tumoral. Las células presentadoras de antígeno son las principales responsables del inicio y mantenimiento de la respuesta inmunitaria intra-tumoral, entre ellas las DC y los LB. Los antígenos presentados *in situ* son putativamente derivados del material tumoral, aunque otros agentes externos pueden ejercer un sesgo en el peptidoma presentado, tales como la presencia de virus en latencia.

Teniendo todo esto en cuenta, la hipótesis de este trabajo es que mediante el estudio del repertorio de TCR y del peptidoma presentado por APC se pueden establecer diferencias en el reconocimiento por parte de los T-TIL CD4+ y CD8+ así como monitorizar la respuesta intra-tumoral.

Objetivos

A partir de la hipótesis planteada se han establecido los siguientes objetivos:

Objetivo 1. Caracterizar los T-TIL en tumores de cáncer de mama a partir de cultivos iniciales para identificar qué parámetros son definitorios de respuesta CD4+ y CD8+.

Objetivo 2. Estudiar las diferencias del repertorio de TCR, así como de sus propiedades fisicoquímicas, entre T-TIL CD4+ y CD8+ expandidos y purificados.

Objetivo 3. Describir las diferencias del inmunopeptidoma presentado por células dendríticas con distintos alelos de HLA-DR pulsadas con un mismo extracto tumoral.

Objetivo 4. Definir una estrategia para el estudio del papel de los B-TIL a partir del uso de linfomas B derivados de xenoinjertos y monitorizar la respuesta de los T-TIL en presencia de LB EBV+ como APC.

Material y métodos

M1. Muestras

M1.1. Biopsias de cáncer de mama

Las biopsias de cáncer de mama se obtuvieron de material surplus hospitalario, extraídas por métodos estándar de cirugía y donadas por el Hospital Quirón de Barcelona y el hospital Vall d'Hebrón de Barcelona. Se obtuvo la aprobación apropiada del Comité Ético y Científico de ambas instituciones, así como el consentimiento de las pacientes, de acuerdo con los requisitos de las juntas de revisión institucionales locales.

Tras la obtención de las biopsias, se almacenaron en tubos con medio de cultivo para LT (*Iscore's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) GlutaMAX™* (Gibco) suplementado con 1 % Penicilina – Estreptomina (Sigma-Aldrich) y 10 % de suero humano descomplementado (preparado en el laboratorio)) y fueron posteriormente procesadas en el laboratorio, en un margen de tiempo no superior a las 24h. Se cortaron en varias porciones pequeñas, numeradas en función de su posición en la biopsia. En total, se han analizado 11 biopsias, mostradas en la Tabla 2.

Tabla 2. Resumen de las biopsias de cáncer de mama utilizadas.

Tipo cáncer de mama	Nombre biopsia	Edad	Grado de infiltración ¹	Muestras de la biopsia (secciones)	Cultivo inicial	Células expandidas y sorteadas	
						CD4+	CD8+
CMTN	BC-PS- 562 (562)	44	Alto	562.4			
				562.6			
				562.7			
				562.11			
CMTN	BTLQ1 (Q1)	58	Inter	Q1.1B			
				Q1.3D			
				Q1.4B			
				Q1.8D			
				Q1.9D			
CMTN	BTLQ2 (Q2)	61	Inter	Q2.2M			
				Q2.8D			

Material y métodos

Tipo cáncer de mama	Nombre biopsia	Edad	Grado de infiltración ^a	Muestras de la biopsia (secciones)	Cultivo inicial	Células expandidas y sorteadas	
						CD4+	CD8+
CMLB	BTLQ7 (Q7)	43	Alto	Q7.5 Q7.6 Q7.8			
CMLB	BTLQ8 (Q8)	42	Bajo	Q8.3 Q8.4 Q8.5			
CMTN	BTLQ10 (Q10)	63	Inter	Q10.1 Q10.3 Q10.5			
CMLB	BTLQ12 (Q12)	55	Inter	Q12.3 Q12.4 Q12.5			
CMLA	BTLQ14 (Q14)	48	Inter	Q14.2.1 Q14.2.2 Q14.2.3 Q14.2.4			
CMLA	BTLQ15 (Q15)	55	Bajo	Q15.2.1 Q15.2.2 Q15.2.3			
CMLA	BTLQ16 (Q16)	63	Inter	Q16.1.1 Q16.2.1			
CMLB	BTLQ17 (Q17)	74	Bajo	Q17.3.2 Q17.3.3 Q17.3.5			

^aGrado de infiltración de TIL, definido siguiendo los criterios establecidos por Salgado et al.⁷⁴. Las celdas en verde indican que se ha realizado la secuenciación del TCR. TN, triple negativo; LA, luminal A, LB, luminal B.

M1.2. Linfocitos T control

Las muestras de LT control se obtuvieron de 20 ml de sangre de 6 donantes sanos, 3 hombres y 3 mujeres, de entre 20 y 30 años. El resumen de las muestras utilizadas se muestra en la Tabla 3. Se consideraron donantes sanos aquellos que no sufrieran ningún tipo de infección en el momento de la extracción, así como ninguna enfermedad de etiología inmune. Se descartaron los donantes recientemente vacunados. La sangre fue extraída por el Servei Assistencial de Salut de la Universitat Autònoma de Barcelona, con consentimiento firmado por los donantes voluntarios.

Tabla 3. Resumen de muestras de LT obtenidas de donantes sanos.

Muestra	Sexo biológico	Edad	Número de células iniciales sin expandir (x 10 ⁶)			Número de células expandidas y sorteadas (x 10 ⁶)		
			PBMC	CD4+	CD8+	LT	CD4+	CD8+
P22-01	M	22	1	1.5	1.5	1	1.4	1.4
P22-02	M	28	1	1.5	1.5	1	1.5	1
P22-03	F	24	1.25	1.8	1.2	2	1.2	1.3
P22-04	F	22	1	1.3	0.58	2	1.4	2.2
P22-05	M	25	1.5	1.35	0.75	1.73	0.8	1.3
P22-06	F	25	1.5	1.35	0.5	5	2.3	2.13

M1.3. Muestras de células dendríticas derivadas de monocitos

Para la obtención de células dendríticas derivadas de monocitos, se usaron residuos leucocitarios, posteriormente genotipados, obtenidos del Biobanco del Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León. El resumen de muestras utilizadas y el tipaje del locus DRB1 se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Resumen de muestras de MoDC obtenidas de donantes sanos.

Nombre de la muestra	Número de células DC obtenidas (x 10 ⁶)	HLA-DR	Extracto proteico/tiempo de pulso ^a
DC19-01	5,1	DRB1*03:01, DRB1*13:01	MCF-7/24h
DC19-02	8	DRB1*13:05, DRB1*15:01	MCF-7/24h
DC19-03	17,3	DRB1*13:02, DRB1*04:04	MCF-7/24h
DC19-07	6,1	DRB1*07:01, DRB1*13:02	MCF-7/24h
DC19-12	5,1	DRB1*03:01, DRB1*13:03	MCF-7/24h
DC19-14	3,4	DRB1*01:02, DRB1*13:02	MCF-7/24h
DC19-21	1,55	DRB1*13:01, DRB1*13:02	Control/-
DC19-22	5,4	DRB1*07:01, DRB1*07:01	Control/-

^aTratamiento de la muestra. MCF-7, pulsada con un extracto proteico de la línea celular tumoral de CM MCF-7 (500 µg). Control, sin pulsar.

M1.4. Muestras del estudio de los B-TIL EBV+ del XAL generado en un PDX⁴

Se generó un PDX mediante el implante de una biopsia TN (562). Tras tres pases en ratón, se obtuvo el tejido tumoral linfocítico XAL. El tumor se colectó en tampón fosfato salino (PBS, *Phosphate-buffered Saline*, 2 mM NaH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl) y se disgregó usando un bisturí. El tejido triturado fue resuspendido en 5 ml de medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) (Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) descomplementado, 1 % de Penicilina – Estreptomina (Sigma-Aldrich) y 300 U/ml de colagenasa tipo IA (Sigma-Aldrich), y se incubó dos veces en un agitador a 80 x g y 37°C durante 30 min. Tras centrifugar el tejido disgregado, se pasó el *pellet* por filtros de 100 µm y 40 µm para obtener una suspensión celular uniforme. El resumen de las muestras utilizadas para este estudio se muestra en la Tabla 5.

⁴ Capítulo IV. Estudio de linfocitos B Epstein-Barr Virus+ infiltrantes de tumor en la respuesta inmunológica en cáncer de mama: informe de un caso (página 167).

Tabla 5. Resumen de muestras del estudio de los B-TIL EBV+ de un XAL generado en un PDX.

Muestras	Tipo de muestra	Procedencia	Secuenciación		Análisis del repertorio de péptidos presentados
562.3	Tejido criopreservado		BCR	TCR	-
562.5	Tejido criopreservado	Biopsia 562	BCR	TCR	-
562.8	Tejido criopreservado	(ver detalles en Tabla 2)	BCR	TCR	-
562.6	Cultivo de T-TIL		-	TCR	-
XAL	Tejido criopreservado	Tumor XAL generado en un PDX (ratón NGS)	BCR	TCR	-
XAL-LCL	Cultivo de una LCL		BCR	-	Asociados a HLA-ABC y a HLA-DR

M2. Cultivos celulares

M2.1. Purificación de células mononucleares de sangre periférica

La obtención de PBMC se realizó partiendo de sangre periférica de donantes sanos – para el cultivo de LT control – o de residuos leucocitarios – para la obtención de y diferenciación de monocitos a células dendríticas. Tanto los residuos leucocitarios como la sangre fueron diluidos 1:2 en PBS. Los PBMC fueron separados mediante un gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque (Lymphoprep, Alere Technologies), centrifugando 30 min a 600 x g a temperatura ambiente (Ta). Los PBMC se recolectaron de su fase y se realizaron varios lavados con PBS y por centrifugación; un primer lavado con PBS a Ta, 10 min a 480 x g, un segundo lavado con PBS frío (4°C), durante 10 min, a 350 x g y 4°C, para la eliminación de plaquetas, y tres lavados con PBS frío a 400 x g y 4°C.

M2.2. Linfocitos T

M2.2.1. Obtención y cultivos iniciales de los linfocitos T infiltrantes de tumor

Para la obtención de los T-TIL, se pusieron en cultivo las porciones de biopsia cortadas, como explantes, en placas de 48 pocillos, poniendo una porción por pocillo. Las células se cultivaron en 1 ml de medio de cultivo de LT en el que se añadieron

Material y métodos

100 U/ml de IL-2 (proporcionada por el NIH). La mitad del volumen del medio se retiró y congeló cada 5 días, para el posterior análisis de citocinas, y se reemplazó con medio fresco e IL-2 a la misma concentración. Los cultivos iniciales se mantuvieron entre 2 y 4 meses, dependiendo de la biopsia, en incubadores a 37°C y 5 % CO₂.

M2.2.2. Linfocitos T de sangre periférica de donantes sanos

Los LT de sangre periférica control se obtuvieron de los PBMC de las muestras de sangre de donantes sanos, separados por gradiente de densidad. Con los PBMC obtenidos, por un lado, se recogieron muestras directamente para el análisis del repertorio del TCR en conjunto. Por otro lado, se marcaron y separaron mediante FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) LT CD3+CD4+ y CD3+CD8+, para el análisis del repertorio en las dos subpoblaciones. Por último, se pusieron en cultivo una parte de los PBMC para la expansión de LT siguiendo el mismo protocolo que el de los T-TIL obtenidos de las biopsias, para su posterior separación mediante FACS de las subpoblaciones CD3+CD4+ y CD3+CD8+.

M2.2.3. Expansiones de linfocitos T

Entre 2 y 4 semanas después de la puesta en cultivo de las biopsias, los T-TIL se expandieron mediante el uso de TransAct™ (Milteny Biotec), una nanomatriz polimérica conjugada a agonistas de CD3 y CD28 humanizados. Se cultivaron 3 x 10⁵ células/pocillo en placas de 96 pocillos en un volumen final de 200 µl de medio de cultivo de LT, a 37°C y 5 % CO₂. Al segundo día, se retiró el reactivo, reemplazando 190 µl por medio de cultivo de LT fresco, suplementado con IL-2 a 100 U/ml. Las suspensiones celulares se dividieron en dos (ratio 1:2) cada 2 días, hasta el día 14-15, en el que se recogieron las células para realizar la separación mediante FACS de las subpoblaciones CD3+CD4+ y CD3+CD8+. Para los controles, se usó el mismo protocolo usando los LT obtenidos de sangre periférica de donantes sanos.

M2.3. Células dendríticas derivadas de monocitos

Para la obtención de células dendríticas derivadas de monocitos (MoDC), los monocitos se obtuvieron cultivando los PBMC, obtenidos de los residuos leucocitarios, en *flasks* T75 (entre 150 – 200 x 10⁶ células) con 8 ml de medio o en T175 (350 x 10⁶ células) con 12 ml de medio para células dendríticas (IMDM GlutaMAX™ (Gibco) suplementado con 1 % Penicilina – Estreptomocina (Sigma-Aldrich) y 5 % de suero humano descomplementado (preparado en el laboratorio)). Se incubaron 2h a 37°C i 5 % CO₂ para favorecer la adherencia de los monocitos a los *flasks*, y pasado este tiempo, se recogieron los linfocitos en suspensión, mediante lavados con PBS a Ta. Se añadió medio fresco para células dendríticas (12 ml en los T75 o 15 ml en los T175) suplementado con GM-CSF (a 450 U/ml) y IL-4 (a 300 U/ml) y se incubaron 3 días a 37°C y 5 % CO₂. Al tercer día, se realizó un cambio de medio, incubando primero 1h las células a 4°C y varios lavados con PBS a 4°C – para

despegarlas de los *flasks* – y un centrifugado a 400 x g 5 min a 4°C. Tras la recogida se resembraron en *flasks* T75, a una concentración de 1 x 10⁶ células/ml en 10 ml de medio de cultivo para células dendríticas, suplementado con GM-CSF (a 450 U/ml) y IL-4 (a 300 U/ml) y se incubaron a 37°C y 5 % CO₂. El séptimo día, se añadió directamente a los *flask* un *cocktail* de maduración (TNF- α (500 U/ml), IL-1 β (1000 U/ml) IL-6 (1000 U/ml) y prostaglandina E2 (PGE-2) (10 μ g/ml). En ese momento se añadió conjuntamente el extracto proteico de la línea celular tumoral de mama MCF-7 en los cultivos pulsados, que habían sido preparado anteriormente mediante *freeze and thaw*, añadiendo 1 ml de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl). Se añadió un lisado de 5 x 10⁶ células MCF-7 por *flask*. El último día, se recogieron las MoDC maduras siguiendo el mismo método que el día 3 y se hicieron pellets secos para el posterior análisis de los péptidos. De cada muestra, se separaron 5 x 10⁵ células para teñir y analizar mediante FACS la expresión de los marcadores CD80, CD83, CD86, HLA-ABC y HLA-DR, para comprobar el estado de maduración.

M2.4. Línea celular XAL-LCL

M2.4.1. Generación de la línea XAL-LCL

Tras la digestión del tumor XAL obtenido, se cultivaron los LB (XAL-LCL) obtenidos de la suspensión celular a una concentración final de 3 x 10⁵ células/ml en *flasks* T75 en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) GlutaMAX™ (Gibco), 1 % de Penicilina – Estreptomicina (Sigma-Aldrich) y 10 % de SFB descomplementado (Gibco).

M2.4.2. Co-cultivos de T-TIL con células de la línea XAL-LCL

Se realizaron co-cultivos de los T-TIL 562.6 con las células XAL-LCL, cultivando los LT a una concentración final de 3 x 10⁵ células/ml en medio de cultivo de LT e IL-2 a 100 U/ml. En el mismo cultivo se añadieron células XAL-LCL y PBMC alogénicos previamente irradiados a 60 Gy y 30 Gy, respectivamente. Entre los días 7 y 10 se añadieron Dynabeads (Gibco) conjugadas a anti-CD3 y anti-CD28 humanos. Como control, las mismas T-TIL se cultivaron utilizando un método de expansión rápida (REM) (REF). Se cultivaron 1-1.5 x 10⁵ células T en presencia de *feeders* (25 x 10⁶ PBMC alogénicos previamente irradiados a 30 Gy) en un *flask* T25 con 25 ml de medio de LT suplementado con 50 ng/ml de anti-CD3 soluble (OKT3) e IL-2 a 100 U/ml. El quinto día, se retiró la mitad del medio y se reemplazó con medio nuevo con IL-2 a 100 U/ml. Entre 10 y 12 días después de la estimulación, las células ya expandidas (aproximadamente 30x) se recogieron para su análisis.

M3. Citometría de flujo

M3.1. Tinciones de marcadores de membrana

Entre $2-5 \times 10^5$ células se marcaron con anticuerpos anti-humanos durante 20 min a 4°C en la oscuridad, diluidos en PBS con 2 % suero fetal bovino (SFB). Tras la incubación, se realizaron dos lavados con PBS con 2 % SFB y se recogieron en 200 μ l de PBS en tubos de citometría para su análisis. Los anticuerpos usados para las distintas tinciones se muestran en la Tabla 6. Se usaron los equipos BD FACSCanto y BD FacsJazz para los análisis fenotípicos y para las separaciones celulares, respectivamente. Los análisis de las tinciones se realizaron usando el software FlowJo v10.4.

Tabla 6. Anticuerpos usados para las tinciones de membrana.

Uso	Anticuerpos usados y fluorocromos conjugados	Concentración	Casa comercial
Fenotipo de LT (T-TIL y control) y separación por FACS de LT CD4+ y CD8+	anti-CD3-FITC o anti-CD3-PerCP	1/16 (3 μ l en 50 μ l)	BD Pharmingen
	anti-CD4-PE o anti-CD4-FITC		
	anti-CD8-APC o anti-CD8-FITC		
	anti-CD80-PE		
Fenotipo de MoDC	anti-CD83-PE	1/16 (3 μ l en 50 μ l)	Milteny Biotec
	anti-CD86-APC		Milteny Biotec
	anti-HLA-ABC-APC		BD Pharmingen
	anti-HLA-DR-FITC		BD Pharmingen
	anti-CD19-PE		BD Pharmingen
	anti-CD20-PE		BD Pharmingen
	anti-CD21-FITC		BD Pharmingen
Fenotipo de las células XAL-LCL	anti-CD38-PE-Cy7	1/16 (3 μ l en 50 μ l)	BD Pharmingen
	anti-HLA-ABC-APC		BD Pharmingen
	anti-HLA-DR-PE		BD Pharmingen
	anti-CD80-FITC		ImmunoTools
	anti-CD86-FITC		ImmunoTools
	anti-PD-L1-FITC		BD Pharmingen

M3.2. Inmunoensayos *bead-based* de detección de moléculas solubles

Para el análisis y cuantificación de moléculas solubles, se usaron los sobrenadantes recolectados en los días 5, 10, 15 y 20 de los cultivos iniciales de T-TIL. Se estudió la secreción de 13 moléculas humanas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ , TNF- α , Fas soluble (sFas), ligando de Fas soluble (sFasL), granzima A, granzima B, perforina y granulicina). Para ello se usó el el kit *bead-based* LEGENDplex™ Human CD8/NK Panel (13-plex) (BioLegend), siguiendo las instrucciones del proveedor. De forma breve, se usó una mix de bolas diferenciadas por tamaño e intensidades de fluorescencia distintas, conjugadas a anticuerpos específico contra las moléculas estudiadas. La mix se incubó con los sobrenadantes y tras los lavados, se incubó con un *cocktail* de anticuerpos de detección biotinilados, específicos para las mismas moléculas analizadas. Finalmente, se añadió estreptavidina conjugada con PE (SA-PE), proporcionando diferentes intensidades de fluorescencia en proporción al analito unido a las bolas y a los anticuerpos. Los análisis se realizaron usando los equipos BD FACS Canto y CytoFlex S (Beckman Coulter Life Sciences).

M4. Extracciones de ácidos nucleicos

M4.1. Extracciones de ADN

Las extracciones de ADN se realizaron mediante la extracción por fenol-cloroformo. Se resuspendieron *pellets* celulares de entre 1 y 30 x 10⁶ células en 500 μ l de buffer de lisis (100 mM NaCl, 10 mM TrisCl (pH = 8), 25 mM EDTA (pH = 8), 0.5 % SDS, 0.5 % proteinasa K en H₂O) y se incubaron *overnight* a 37°C. Se añadió un volumen de fenol equilibrado con TRIS a pH = 8 y se separó la fase inferior, se agitó durante 5 min por inversión y, tras un lavado a 300 x g 10 min a Ta, se transfirió a un tubo limpio y se añadió un volumen de fenol:cloroformo:isoamilalcohol (24:25:1). Se recogió la fase inferior y se volvió a agitar 5 min por inversión, se centrifugó a 300 x g 10 min a Ta y se transfirió la fase acuosa (sobrenadante) a un tubo limpio. Se añadió un volumen de cloroformo, se agitó 5 min por inversión y se centrifugó a 300 x g 10 min a Ta. La fase acuosa (sobrenadante) se transfirió a un tubo limpio, se le añadió un 10 % del volumen de 3M acetato sódico, un volumen de isopropanol y se agitó por inversión. Se centrifugó a 12000 x g 10 min a 4°C, se realizó un lavado con del *pellet* con 500 μ l de etanol 70 % y se volvió a centrifugar con las mismas condiciones. Tras quitar con cuidado el sobrenadante, se dejó secar el *pellet* en la campana de extracción de gases y se resuspendió con 30 μ l de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH = 8). Finalmente se midió la concentración y las absorbancias a 230, 260 y 280 para comprobar la pureza del ADN extraído, usando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

M4.2. Extracciones de ARN

Las extracciones de ARN se realizaron mediante los kits comerciales RNeasy Micro Kit y RNeasy Mini Kit (QIAGEN), en función del número de células usadas (entre 1×10^5 y 1×10^6), y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células diluidas en buffer RLT con 10 % β -mercaptoetanol se pasaron por una jeringa de 1 ml de con una aguja de 0.9 x 25 mm para romper sus membranas. Se realizó una digestión con DNasa en columna opcional durante el aislamiento del ARN utilizando el kit RNase-Free DNase Set (QIAGEN). El ARN extraído se cuantificó primero con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific), así como las absorbancias a 230, 260 y 280, para comprobar su pureza. Finalmente, la cantidad de ARN y su integridad se midieron con un Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies). Se usaron ARN con un RIN superior a 7.

M5. Secuenciación de los TCR y BCR

M5.1. Repertorio de TCR en los cultivos de T-TIL

Los repertorios de TCR de los cultivos de T-TIL se evaluaron por un método basado en PCR, usando el kit SMARTer Human TCR a/b Profiling Kit (Takara Bio), que permite la captura completa de las regiones variables V(D)J de los transcritos de TCR y la producción de librerías directamente indexadas para la secuenciación. Se amplificaron tanto la cadena alfa como la cadena beta de los TCR, usando ARN como material de partida (extraído de entre 1×10^5 y 1×10^6 células). Las purificaciones de las librerías amplificadas se realizaron utilizando las bolas Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter), siguiendo las recomendaciones comerciales. Las secuenciaciones se realizaron en un secuenciador Illumina MiSeq, usando el 600-cycle MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) con *paired-end*, 2 x 300 pares de bases emparejadas.

M5.2. Repertorio de TCR y BCR en tejidos

Para el estudio del repertorio de TCR en tejidos criopreservados, se usó ADN extraído del tejido previamente disgregado por sonicación. Las amplificaciones tanto del BCR como del TCR se realizaron externamente usando la tecnología ImmunoSEQ (Adaptive Biotechnologies). Para la secuenciación del BCR en el cultivo del XAL-LCL se usó la misma tecnología.

M6. Elución de péptidos presentados por las moléculas de HLA-ABC y -DR

M6.1. Acoplamiento de los anticuerpos a las bolas de sefarosa

Los anticuerpos anti-HLA-ABC w6/32 y anti-HLA-DR B8.11.2 se unieron a bolas de sefarosa (*CNBr activated sepharose 4B* (GE Healthcare)) para obtener una concentración final de 4 mg/ml. Las bolas de sefarosa se pesaron, se resuspendieron

en HCl 1mM, se incubaron 15 min en rotación a Ta y se centrifugaron a 500 x g y 20°C. Se repitió el proceso por segunda vez, sin la incubación. Las bolas hidratadas se lavaron dos veces con 20 ml de buffer de acoplamiento (NaHCO₃ 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH = 8.3) y centrifugaciones a 500 x g durante 2 min a 20°C. Se añadió 1 ml de buffer de acoplamiento por cada 330 mg de bolas y se añadió la cantidad necesaria de anticuerpo para obtener una concentración final de 4 mg/ml de bolas. Se incubaron las bolas con el anticuerpo durante 4h a en rotación a Ta y se realizaron dos lavados con 3 ml de buffer de bloqueo (Tris-HCl 0.1 M, pH = 8) y centrifugaciones a 500 x g durante 2 min a 20°C. Se volvieron a añadir 3.5 ml de buffer de bloqueo y se incubaron 2h a Ta en rotación. Se volvieron a centrifugar durante 2 min a 500 x g y 20°C y se resuspendieron en 3 ml de buffer de lavado 1 (NaC₂H₃O₂ trihidratado 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH = 4), se centrifugó en las mismas condiciones y se lavaron con buffer de lavado 2 (Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH = 8). Se repitieron dos veces más estos lavados con los buffers de lavados 1 y 2 intercalados. Finalmente, las bolas de sefarosa unidas al anticuerpo se resuspendieron en un volumen de buffer de lavado 2 por cada ml de bolas para su almacenamiento a 4°C.

M6.2. Lisis celular y recolección de las membranas celulares

Los *pellets* celulares de moDC (ver número de células en Tabla 4), así como de las células XACBCL-LCL (dos *pellets* de 40 x 10⁶), se usaron para la elución de péptidos presentados por HLA-ABC y HLA-DR. La lisis celular se realizó en buffer de lisis (50 mM Tris-HCl (pH = 8.0), 150 mM NaCl, inhibidor de proteasas (1 x *Complete protease inhibitor* (Roche) y 5 mM EDTA). Para los *pellets* ≥ 40 x 10⁶ células, los núcleos y restos celulares se eliminaron con dos centrifugaciones de 12 min a 5500 x g tras sonicaciones (40 % de amplitud de máximo 130W) y 10 minutos de incubaciones a 4°C. Las membranas se recolectaron de los sobrenadantes, se ultracentrifugaron 1 h a 72000 x g y 4°C y se resuspendieron en buffer de solubilización (1 % n-dodecil-β-D-maltosida, 50 mM Tris-HCl (pH = 8.0), 150 mM NaCl, inhibidor de proteasas (1 x *Complete protease inhibitor* (Roche)) y 5 mM EDTA). Las membranas solubilizadas se sonicaron 4x 5 segundos (20 % de amplitud de máximo 130 W) y se incubaron overnight a 4°C. Finalmente, se ultracentrifugaron a 55000 x g 1h a 4°C y los complejos HLA en el sobrenadante se purificaron de la fracción soluble. Para los *pellets* < 40 x 10⁶ células, la lisis se realizó resuspendiendo en 0.5 ml de buffer de solubilización, se sonicaron 4x 5s (20 % de amplitud de máximo 130 W) y se incubaron 2h a 4°C. Las membranas solubilizadas se sonicaron 4 veces 5 segundos (20 % de amplitud de máximo 130 W) y se centrifugaron 1h a 20000 x g y 4°C. Los complejos HLA en el sobrenadante se purificaron de la fracción soluble.

M6.3. Inmunoprecipitaciones

Las bolas de sefarosa conjugadas a los anticuerpos se lavaron 3x con 50 mM Tris-HCl (pH = 8), 150 mM NaCl y 0.5 % n-Dodecyl-β-D-maltoside (Thermo Fisher) y 3x 50

Material y métodos

mM Tris-HCl (pH = 8) y 150 mM NaCl. Las interacciones inespecíficas se disminuyeron mediante lavados con un buffer con alta concentración de sales (50 mM Tris-HCl (pH = 8), 0.5 M NaCl). Los complejos péptido-HLA se eluyeron con 0.25 % TFA (ácido trifluoroacético) tras tres lavados con 50 mM Tris-HCl (pH = 8) y 150 mM NaCl y un lavado con Tris-HCl (pH = 8). Los complejos eluidos fueron desalados y lavados mediante puntas C18 (ZipTip Pipette Tips C18, p10 (Merck Milipore)) y SCX (TopTips with PolySulfoethyl A (Cluexau)) antes de la espectrometría de masas.

M6.4. Análisis de la espectrometría de masas

Las muestras fueron analizadas por cromatografía líquida – espectrometría de masas (LC-MS) por el Laboratorio de Proteómica CSIC/UAB (Bellaterra, Barcelona, España). Se utilizó el espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher) equipado con una fuente nanoESI y acoplado a un sistema nanocromatográfico. La separación por LC se realizó usando un gradiente de acetonitrilo de 140 min. Los análisis se realizaron en modo data-dependiente a una resolución de masa objetivo de 60000 (a m/z 400). El CID seleccionó y fragmentó hasta 10 de los picos más intensos con carga ≥ 2 y una intensidad por encima del umbral de 500 unidades. Para minimizar la selección redundante de iones precursores, la exclusión dinámica se estableció en 1 durante 45 s. Los datos sin procesar se procesaron utilizando el Proteome Discoverer 1.4 contra la base de datos de proteomas virales y humanos (UniProt/SwissProt) con los siguientes parámetros: sin enzima, tolerancia de masa de precursor de 20 ppm, tolerancia de fragmento de 0.02 Da y modificación variable de metionina oxidada (+16 Da). Las coincidencias espectrales de péptidos se filtraron al 1 % de FDR usando Percolator.

M7. Análisis bioinformático

M7.1. Análisis del repertorio de TCR

M7.1.1. Alineamiento de las librerías

Los resultados de la secuenciación del TCR obtenidos mediante la tecnología ImmunoSEQ (Adaptive Biotechnologies) y mediante el SMARTer Human TCR a/b Profiling Kit (Takara Bio) se alinearon usando la herramienta pública MiXCR Immune Repertoire Analyzer²⁸⁰.

M7.1.2. Análisis de las características del repertorio de TCR

Los datos se procesaron utilizando el *framework* público VDJTools v1.2.1²⁸¹ y en R v3.6.1²⁸² usando el paquete Immunarch²⁸³. Las rutinas utilizadas y sus usos se muestran en la Figura 6. De forma resumida, mediante Immunarch²⁸³ se realizaron: las curvas de rarefacción, las cuales estiman el número de secuencias CDR3nt que se encontrarían extrapolando a un tamaño concreto, en este caso al de la muestra de

mayor tamaño; la distribución de secuencias según el tamaño del CDR3nt; la distribución según la abundancia relativa y el solapamiento (*overlap*) de secuencias entre muestras (análisis de secuencias públicas). Mediante VDJTools²⁸¹, se realizó una descontaminación de las secuencias y se excluyeron los clones no productivos, i. e., se eliminaron secuencias que podrían ser contaminantes y aquellas que, por errores de secuenciación, no fueran secuencias codificantes. Con estos datos se estudió la longitud del CDR3nt y de la región N(D)Nnt y los niveles de convergencia. Paralelamente, se colapsaron los datos por secuencias de aminoácidos del CDR3, es decir, se sumaron los clones con distintas secuencias nucleotídicas codificando para una misma secuencia aminoacídica y se recalcularon las frecuencias. Con estos datos se hizo el estudio de las propiedades bioquímicas de las secuencias CDR3aa (hidropatía, carga y polaridad) considerando solamente la región 5-mer central. El estudio de la diversidad se realizó usando el índice de Shannon-Wiener normalizado (nS-W). El índice de S-W – originalmente descrito en ecología – tiene en cuenta el número de especies distintas en una muestra (riqueza) y en qué abundancia se encuentran (uniformidad). La normalización del índice S-W resulta de la división del índice anterior por el logaritmo de número de clones encontrados. Se compararon los resultados de la secuenciación para encontrar secuencias en común (secuencias públicas). Por último, para el estudio de los T-TIL en el XAL se realizó un estudio de las secuencias más frecuentes entre distintas muestras, mediante *heatmat plots* de seguimiento. Los cálculos que realizan las herramientas descritas están definidas en los documentos informativos online creados por sus desarrolladores^{284,285}. Los gráficos que no se generaron automáticamente mediante estas herramientas bioinformáticas, se realizaron usando el software GraphPad Prism 7.0. Los gráficos *upset plots* se generaron mediante R (versión 3.6.1)²⁸² y los paquetes ‘dplyr’²⁸⁶, ‘RColorBrewer’²⁸⁷ y ‘UpSetR’²⁸⁸.

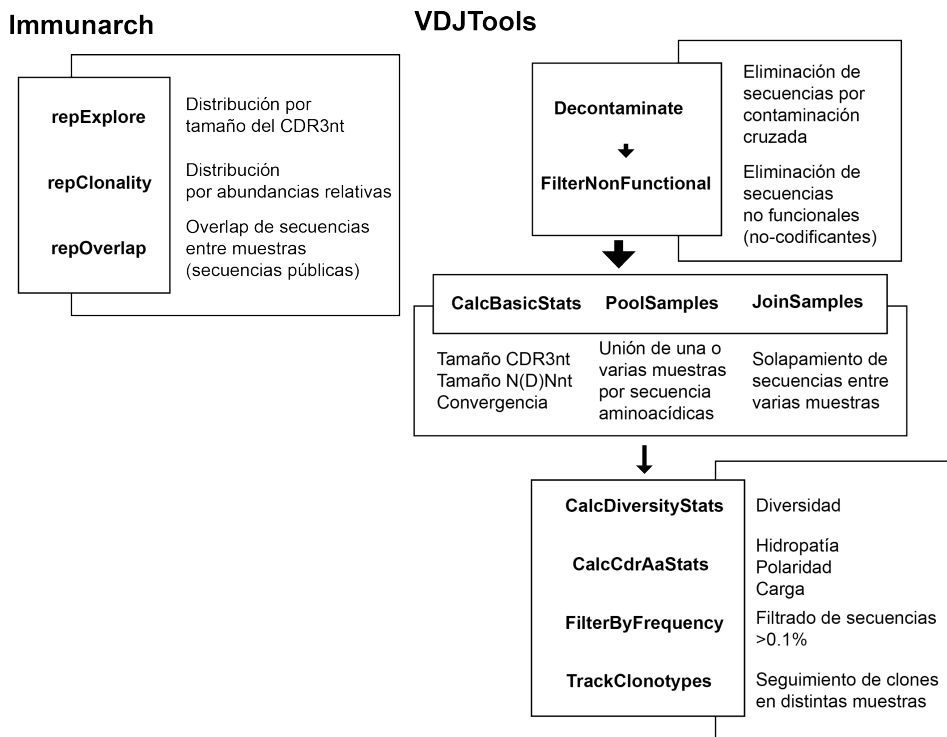


Figura 6. Rutinas utilizadas para el análisis de los repertorios de TCR con los programas Immunarch²⁸³ y VDJTools²⁸¹ y sus usos. Se muestran las rutinas y la explicación resumida de las funciones que realizan.

M7.1.3. Análisis de TCR públicos en la bibliografía

Las secuencias de TCR procesadas mediante VDJTools¹²⁸¹, usando aquellas más frecuentes, se compararon con la base de datos McPAS-TCR²⁸⁹ con una distancia de Levenshtein de 1 (como máximo una diferencia nucleotídica, incluyendo cambios, deleciones e inserciones).

M7.1.4. Análisis de motivos en CDR3

Se usó la herramienta de uso libre GLIPH2^{290,291} para encontrar motivos de similitud en las regiones CDR3 de los TCR. De los datos obtenidos, se seleccionaron solamente aquellas con *scores* <0.5 en los análisis estadísticos de Fisher y en el test de expansión. Las secuencias obtenidas tras este análisis se reanalizaron mediante VDJTools, siguiendo los mismos métodos anteriormente descritos.

M7.2. Análisis del repertorio de BCR

El alineamiento y procesamiento de los datos obtenidos de la secuenciación del BCR mediante la tecnología ImmunoSEQ se hizo directamente usando su plataforma de análisis (ImmunoSEQ Analyzer).

M7.3. Análisis de los péptidos derivados de HLA-ABC y HLA-DR

Los péptidos identificados fueron pre-filtrados siguiendo las siguientes normas: eliminación de (I) péptidos fuera del rango 8-13-mer y péptidos por debajo de 10-mer, para el análisis de péptidos asociados a clase I y clase II, respectivamente; (II) péptidos derivados de queratinas (mayoritariamente presentes por contaminación); y (III) péptidos duplicados con modificaciones. La información sobre la localización subcelular de las proteínas de origen se extrajo de la base de datos Uniprot²⁹². Las proteínas que se encontraron en más de una ubicación subcelular se contaron en ambas ubicaciones. Se usó la herramienta DAVID^{293,294} – que ejecuta agrupamientos funcionales utilizando diferentes bases de datos – se utilizó para el análisis de enriquecimiento de vías KEGG Pathway Database, que determina qué vías están enriquecidas en un conjunto de proteínas. Se realizó un *clustering* con Gibbs²⁹⁵ de los péptidos obtenidos, excluyendo los péptidos encontrados en *nested-sets* y dejando solo el péptido más corto, para comprobar que los clusters generados se correspondían con los motivos descritos para cada alelo de HLA en las bases de datos NetMHCIPan-4.1 y el NetMHCIIpan-4.0²⁹⁶. Se realizó, finalmente, un estudio de predicción de afinidad de los péptidos obtenidos, para asignar los péptidos a cada alelo de las distintas muestras. Para ello, se mantuvieron los péptidos predichos como *strong binders* (SB) o *medium binders* (MB) según el NetMHCIPan-4.1 y el NetMHCIIpan-4.0²⁹⁶ en las muestras de MoDC. Para los péptidos obtenidos de las células XAL-LCL, solamente se mantuvieron aquellos agrupados por Gibbs y considerados SB por el NetMHCIPan-4.0 y el NetMHCIIpan-4.1. Los solapamientos de péptidos y proteínas entre distintas muestras se realizaron manualmente usando tablas dinámicas y hojas de cálculo. Los gráficos *upset plots* se generaron mediante R (versión 3.6.1)²⁸² y los paquetes ‘dplyr’²⁸⁶, ‘RColorBrewer’²⁸⁷ y ‘UpSetR’²⁸⁸. El resto de los gráficos se generaron mediante el software GraphPad Prism 7.0. Los cálculos de las distancias euclidianas, así como los gráficos de agrupaciones jerárquicas derivados de estos, para el estudio de similitud entre patrones de presentación de proteínas se realizaron utilizando el programa Orange Data Mining v3.32²⁹⁷.

M7.3.1. Identificación de proteínas de interés en el repertorio del XAL-LCL

Para excluir péptidos derivados de proteínas comúnmente presentadas por otras líneas celulares linfocíticas (LCL) se compararon las proteínas de origen obtenidas en el análisis de los péptidos asociados a HLA-ABC con 26305 proteínas, extraídas de seis estudios y distintos alelos de HLA-A, HLA-B y HLA-C (7, 11 y 9 alelos, respectivamente)^{298–303}. Se realizó la misma comparación para los péptidos asociados a HLA-DR usando 517 proteínas de 10 estudios distintos y 11 alelos de HLA-DR encontrados en la literatura^{304–313}. Se excluyeron los péptidos con una PSM (del inglés, *peptide-spectrum match*) = 1. Finalmente, se buscaron todas las proteínas restantes en el Human Protein Atlas^{314–316} y se comprobaron sus especificidades en cáncer. El

Material y métodos

número de proteínas, péptidos y PSM se consideraron para representar los datos usando el software GraphPad Prism 7.0.

M8. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos, así como normalizaciones de los datos, se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 7.0. Se utilizaron correlaciones de Pearson para estudiar relaciones entre subtipos de LT, citocinas secretadas y características del TCR. Se usaron regresiones lineales para estudiar: la similitud de la diversidad obtenida en las secuencias TRA y TRB; las relaciones entre el número de *reads* y secuencias CDR3 con el número de motivos y; las relaciones entre el número de péptidos y proteínas compartidos presentados por MoDC con el número total de péptidos y proteínas obtenidos, así como con el número de muestras con el mismo alelo. Se realizaron análisis de varianza unifactoriales (ordinary one-way ANOVA) para comparar características de las secuencias CDR3 entre múltiples grupos de LT. También se realizaron análisis de variancia bifactoriales (ordinary two-way ANOVA) para la comparación entre muestras de distintos subtipos antes y después de las expansiones. Los test *t* emparejadas se usaron para analizar diferencias en la diversidad en las muestras CD4+ y CD8+ procedentes de las mismas secciones de una biopsia. Todos los análisis utilizados se mencionan en los pies de figura.

Capítulo I. Caracterización fenotípica y funcional de los linfocitos infiltrantes de tumor

1.1. Antecedentes

Los T-TIL tienen un papel fundamental en la evolución y el desenlace del cáncer. Sin embargo, la mera presencia de estas células – aunque abundantes – no siempre asegura un buen resultado, y viceversa. De este hecho surge la necesidad de comprender en más profundidad otros factores, como los subtipos celulares infiltrantes, su estado de activación, especificidad y funcionalidad. Tanto los LT CD4+ como los LT CD8+ tienen funciones distintas que ejecutan mediante distintos mecanismos.

Los LT CD4+ orquestan y dirigen la respuesta adaptativa mediante la secreción de determinadas citocinas. Los patrones de citocinas secretados por los distintos subtipos de LT CD4+ (Th1, Th2, Th17, Tfh y Treg) están asociados a factores de transcripción definitorios de linaje (Tbet, GATA-3, ROR γ t, Bcl-6 y FoxP3, respectivamente)³¹⁷. Las células Th1 y Th2 dirigen la respuesta de forma distinta y suelen ser mutuamente excluyentes. El perfil Th1 (IL-2, IFN- γ , TNF- α y TNF- β) media el desarrollo de una respuesta proinflamatoria, la activación de macrófagos y favorece el desarrollo de CTL. La respuesta Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) estimula la producción de mastocitos y eosinófilos y favorece la producción de IgE. Las células Th17 (IL-17 e IL-22) contribuyen al reclutamiento de neutrófilos y monocitos en los sitios de infección e inflamación. Las Tfh (IL-21) son las encargadas de la colaboración con los LB foliculares, responsables de su activación y producción de anticuerpos. Por último, las Treg (IL-10 y TGF- β) presentan la capacidad de inhibir la expansión clonal y la producción de citocinas efectoras.

Los LT CD8+ ejecutan la lisis de las células diana mediante la liberación de factores citotóxicos: perforinas, las cuales generan poros en las membranas de las células diana (tumorales) y granzimas y granzulina que activan la vía de las caspasas induciendo la apoptosis. Los CTL también usan otros mecanismos mediados por la interacción de la molécula FasL (en la membrana de los CTL activados) con Fas (receptor de muerte celular en la membrana de la célula diana).

Dado que el TCR proporciona especificidad de antígeno a los LT, representa un marcador que permite monitorizar el estado y evolución de los T-TIL. Entre las características estudiadas, una de las que más destaca es el análisis de la diversidad, ya que refleja el número de clones distintos, así como su abundancia. En consecuencia, el análisis de la diversidad permite encontrar la presencia de expansiones clonales, indicando activación y respuesta de los LT. Por otro lado, no solamente es importante el análisis de la diversidad sino la caracterización del TCR en los subtipos de LT CD4+ y CD8+, con el fin de determinar si sus receptores presentan características diferenciales intrínsecas a la molécula de tipo fisicoquímico (tamaño del CDR3, carga y polaridad, entre otras).

Capítulo I. Antecedentes

Por último, uno de los principales problemas de la obtención de T-TIL es la baja cantidad de células que pueden extraerse de una biopsia. Un número bajo de linfocitos limita la posibilidad de realizar varios estudios fenotípicos y funcionales en paralelo y, por ello, las células son expandidas para obtener una mayor cantidad. No obstante, durante las expansiones, el repertorio original podría verse sesgado debido a una mayor capacidad proliferativa de ciertos clones. Esto ha sido recientemente demostrado, aunque también se observó que la expansión de T-TIL procedentes de secciones distintas de un mismo tumor, daba lugar a repertorios altamente divergentes³¹⁸. En consecuencia, el cultivo de pequeñas secciones de una misma biopsia permite disponer de varias muestras de T-TIL procedentes de un mismo tumor, pero distintas en cuanto al repertorio, abarcando una mayor parte de la muestra original.

Teniendo en cuenta todo esto, el objetivo de este capítulo ha sido explorar estas características en los infiltrados tumorales de diez biopsias de pacientes con cáncer de mama. Para ello, se han mantenido secciones de cada biopsia en cultivo como explantes por separado. En estos cultivos iniciales, no se han usado reactivos para su expansión o mantenimiento más que un aporte externo de IL-2, con el objetivo de mantener al máximo el infiltrado original. Se han analizado los subtipos celulares CD4+ y CD8+, la producción de citocinas en el sobrenadante y el repertorio de TCR. Por último, se ha hecho un estudio de correlación entre el fenotipo de los T-TIL y el resto de las propiedades estudiadas, con el objetivo final de encontrar cuáles de ellas pueden dar más información sobre cómo es, fenotípica y funcionalmente, el infiltrado tumoral.

1.2. Resultados

1.2.1. Las subpoblaciones de T-TIL CD4+ y CD8+ no están relacionadas con el número de T-TIL CD3+ infiltrantes

Las biopsias se cortaron en pequeños explantes abarcando la totalidad de la muestra de tejido, de forma que se pudo mantener una representación de los T-TIL presentes en las distintas localizaciones de la muestra quirúrgica obtenida, tal y como se explica en material y métodos (página 57). Se recogieron células de los cultivos iniciales a partir del día 10 de cultivo, aproximadamente, momento en el cual el número de linfocitos en los cultivos era suficiente para empezar su caracterización. La presencia de las subpoblaciones CD4+ y CD8+ de T-TIL se estudió mediante la expresión de los marcadores CD3, CD4 y CD8 por citometría de flujo.

Las biopsias no eran homogéneas entre ellas en cuanto a la composición, pero, además, algunas biopsias presentaron porcentajes de subtipos de T-TIL distintos en función de la localización de la sección en el tumor. Se observó, dentro de la población de T-TIL CD3+, no solamente las subpoblaciones CD4+ y CD8+, sino también los subtipos DP y DN. Por este motivo, se calcularon también las ratios CD8/CD4, para tener una medida de comparación directa entre ellas (Figura suplementaria 1A-K). Aunque algunas secciones mostraron variaciones en los porcentajes de las distintas poblaciones en el tiempo de cultivo, en general se mantuvo siempre una cierta predominancia de uno u otra subpoblación celular. Sin embargo, los subtipos celulares DP y DN se vieron más afectados, disminuyendo durante el tiempo de cultivo.

Para determinar si existía correlación entre los porcentajes de LT CD3+ con los valores de LT CD4+ o CD8+, se calculó la correlación entre estos grupos, usando, en primer lugar, las tinciones más iniciales de los cultivos. La mayoría de las secciones contenían porcentajes de LT CD3+ superiores al 60 % y se observaron más secciones con valores CD8/CD4 inferiores 1, es decir, con porcentajes de LT CD4+ superiores a los de CD8+ (Figura 7A). Al separar en grupos de secciones con ratios $CD8/CD4 > 1$ y $CD8/CD4 < 1$, no se observó una correlación significativa entre éstas y el porcentaje de LT CD3+ (Figura 7B, Figura 7C), indicando que un mayor número de LT no supone, en los cultivos más iniciales, un mayor porcentaje de un subtipo celular concreto.

Se realizó el mismo tipo de análisis usando todas las tinciones, independientemente de su fecha en el cultivo, para determinar si el mantenimiento del cultivo inicial tenía efecto en cuanto a la abundancia de las distintas subpoblaciones – permitiendo, además, ampliar el tamaño de la muestra. La mayoría cultivos seguían conteniendo un alto porcentaje de LT CD3+ (Figura 8A), indicando que los LT pueden mantenerse en presencia del explante en presencia de bajas dosis de IL-2. No se observó correlación en las muestras con ratios $CD8/CD4 < 1$, pero se identificó una

Capítulo I. Resultados

correlación inversa significativa ($p = 0.024$) entre las ratios $CD8/CD4 > 1$ y el porcentaje de LT $CD3+$ (Figura 8B, Figura 8C), indicando que en los cultivos con más LT $CD8+$ que $CD4+$, a mayor porcentaje de LT $CD8+$ se encontraba un menor número total de células T $CD3+$. Este resultado podría ser explicado por la propia naturaleza más proliferativa de los LT $CD4+$, provocando que, incluso en aquellos cultivos en los que las células T $CD8+$ predominaban, las células T $CD4+$ siguieran siendo muy abundantes. Esto se vería reforzado por el hecho de que dicha correlación no se observó a los pocos días de iniciar los cultivos. Por lo tanto, mientras que en los cultivos iniciales los linfocitos todavía no habían empezado a proliferar de forma muy notoria, tras semanas de cultivo, éstos, y especialmente los LT $CD4+$, estaban altamente activados y proliferativos.

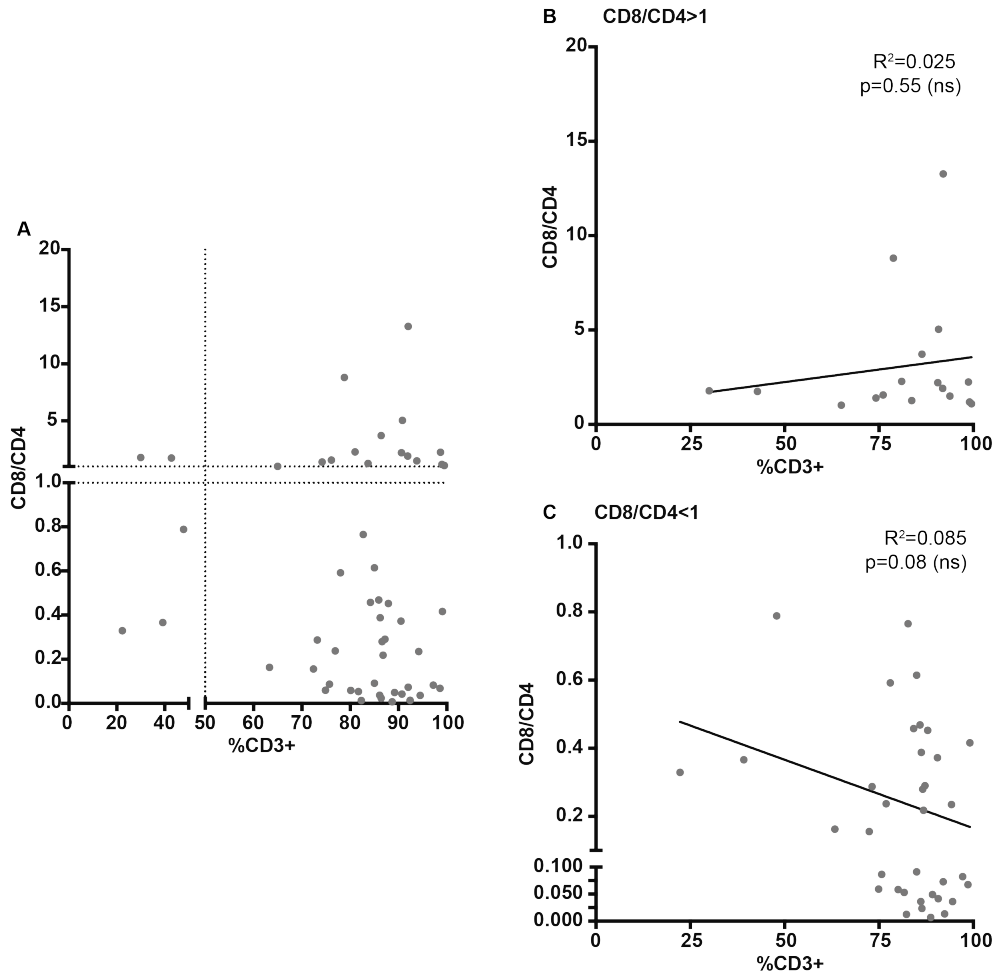


Figura 7. Relación entre porcentajes de linfocitos T CD3+ totales con las ratios CD8/CD4 en los inicios de los cultivos de T-TIL. (A) Distribución general del porcentaje de linfocitos T CD3+ con los valores de las ratios CD8/CD4, calculadas con los porcentajes obtenidos mediante citometría de flujo en el inicio del cultivo de cada muestra. No se observó correlación entre el porcentaje de linfocitos T CD3+ con la ratio CD8/CD4 en las muestras en las que dicha ratio era >1 (B) o <1 (C).

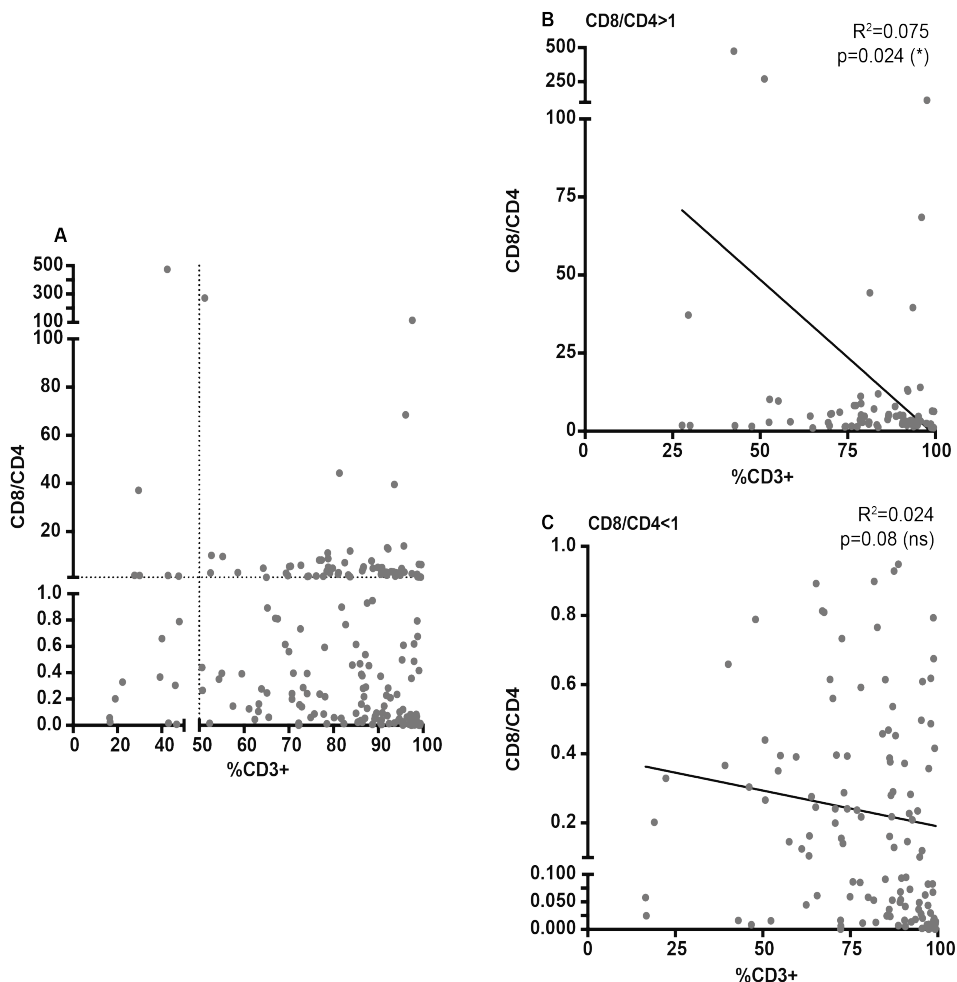


Figura 8. Relación entre porcentajes de linfocitos T CD3+ totales con las ratios CD8/CD4 en los cultivos desde el inicio hasta el fin de cultivo. (A) Distribución general del porcentaje de linfocitos T CD3+ con los valores de las ratios CD8/CD4, calculadas con los porcentajes obtenidos mediante citometría de flujo. Se observó correlación entre el porcentaje de linfocitos T CD3+ con la ratio CD8/CD4 en las muestras en las que dicha ratio era >1 (B) ($p = 0.024$). No se observó correlación entre el porcentaje de linfocitos T CD3+ con la ratio CD8/CD4 en las muestras en las que dicha ratio era <1 (C).

1.2.2. El porcentaje de T-TIL CD4+ en los cultivos iniciales está relacionado de forma inversa con la cantidad de moléculas secretadas con funciones citotóxicas

Para el estudio de las moléculas solubles secretadas por los T-TIL, se usaron los sobrenadantes de los cultivos iniciales de las distintas secciones de las biopsias puestas en cultivo, recogidos en los días 5, 10, 15 y 20. Mediante citometría de flujo (página 61) se analizó la cantidad de IL-4, IL-10 y IL-17A, IFN- γ , TNF- α , sFas, sFasL,

granulinsina, granzima A, granzima B y perforina en los sobrenadantes. En general, la mayoría de las citocinas secretadas se empezaron a detectar a partir de los días 10 y 15, tal y como se muestran en los análisis por biopsia y por sección (Tabla suplementaria 1). De forma similar al estudio de poblaciones CD4+ y CD8+, se observó heterogeneidad entre secciones de una biopsia y no se encontró ningún patrón concreto de citocinas compartido por biopsias o secciones de una misma biopsia.

Posteriormente, se analizó la relación entre las distintas proteínas solubles secretadas y los porcentajes de las subpoblaciones celulares CD4+ y CD8+, así como con las ratios CD8/CD4. Para ello, se usaron los valores obtenidos en las tinciones en los mismos tiempos que la recogida de los sobrenadantes.

En cuanto a la relación con los T-TIL CD4+, no se observaron correlaciones con las citocinas definitorias de los patrones de respuesta Th (IFN- γ en Th1, IL-4 en Th2, IL-17 en Th17). Se observó una correlación inversa significativa entre los T-TIL CD4+ con ciertas citocinas citotóxicas, concretamente, de sFasL, granulinsina, granzima A, granzima B y perforina ($p = 0.0006$, $p < 0.0001$, $p = 0.0012$, $p = 0.0098$ y $p = 0.0026$, respectivamente) (Figura 9, Figura suplementaria 2).

Por el contrario, los porcentajes de LT CD8+ se correlacionaron de forma directa con la de granulinsina y granzima A ($p = 0.025$ y $p = 0.029$, respectivamente) (Figura 9, Figura suplementaria 3). También se observó una relación inversa significativa con la producción de IL-17A ($p = 0.018$), citocina producida por varios tipos celulares (especialmente Th17, pero también Treg o LT $\gamma\delta$) y que se ha asociado tanto a inflamación como a regulación. Por lo tanto, un mayor porcentaje de LT CD8+ desfavorece la producción de IL-17 y sus funciones, entre las cuales se encuentra la regulación.

Se calcularon las correlaciones de Pearson de todos los datos, representados en forma de resumen en la Figura 9. En conjunto, los datos indican que un microambiente con un perfil más citotóxico se relaciona mejor con una baja cantidad de LT CD4+ que con una alta cantidad de LT CD8+, e incluso que la ratio CD8/CD4. Por el contrario, la única citocina de perfil Th correlacionada inversamente con la cantidad de LT CD8+ fue la IL-17A. Respecto a las ratios CD8/CD4, no se encontraron correlaciones significativas con la producción de ninguna citocina (Figura 9, Figura suplementaria 4).

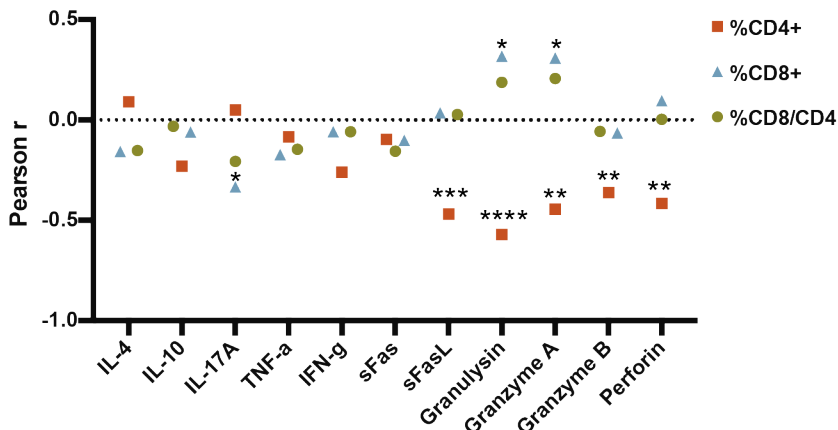


Figura 9. Correlaciones de Pearson obtenidas entre la concentración (pg/ml) de moléculas solubles secretadas en los sobrenadantes y los porcentajes de T-TIL CD4+, CD8+ y las ratios CD8/CD4. Relacionada con las Figura suplementaria 2, Figura suplementaria 3 y Figura suplementaria 4. Los valores individuales se encuentran en Anexos, Tabla suplementaria 1.

1.2.3. Caracterización del repertorio de TCR de los T-TIL en los cultivos iniciales

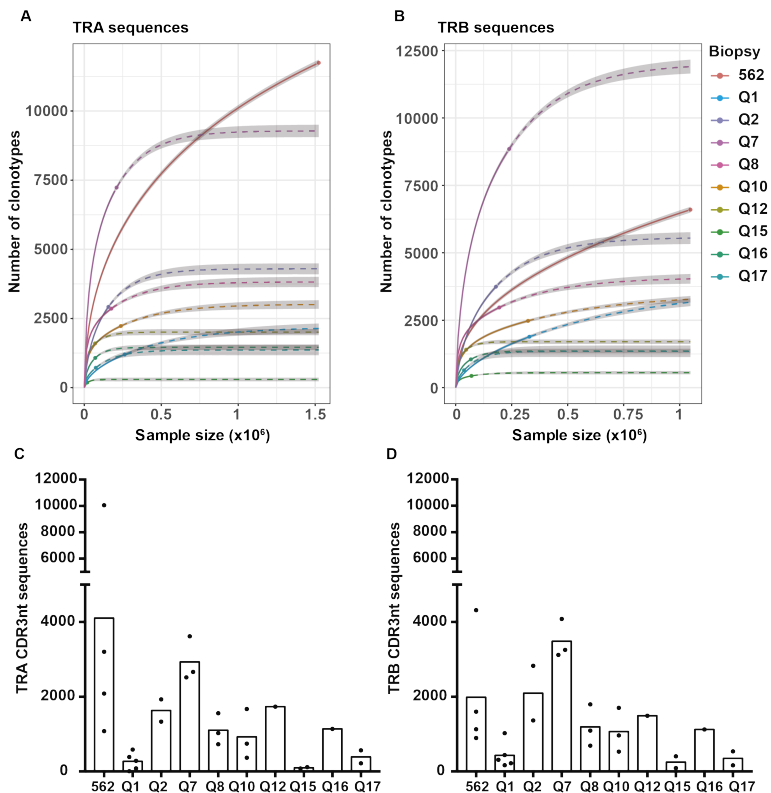
Con el objetivo de caracterizar el repertorio de TCR intra-tumoral, se realizó un primer análisis descriptivo del repertorio de los cultivos iniciales (a partir de, aproximadamente, 10 días después del cultivo de los explantes). Para ello, se analizó: (i) la distribución de los clones en base a sus frecuencias; (ii) el tamaño nucleotídico de las secuencias CDR3 (y su distribución por tamaño); (iii) las propiedades bioquímicas de las secuencias CDR3aa y (iv) los niveles de convergencia. Las caracterizaciones se realizaron tanto en las secuencias TRA como TRB y los datos de la secuenciación se analizaron mediante los *frameworks* MiXCR¹, VDJTools²⁸¹ e Immunarch²⁸³ (ver página 64).

Se obtuvieron un total de 39812 y 35357 secuencias nucleotídicas TRA y TRB, respectivamente (Anexos, Tabla suplementaria 2). Se analizó la riqueza (número de clones – o secuencias – distintos) en cada biopsia en base al tamaño de la muestra (en número de *reads*) y se compararon los resultados mediante curvas de rarefacción. Estas permiten extrapolar el número de clones observados al tamaño de la muestra con mayor número de *reads* (ver página 64), en este caso la biopsia 562. Se observó una riqueza similar en casi todas las biopsias, exceptuando la 562 en las secuencias TRA (Figura 10A) y la Q7 tanto en las TRA como en las TRB (Figura 10B) que, teniendo en cuenta el tamaño de la muestra, presentó un número de clonotipos muy elevado (8803 y 10457 secuencias TRA y TRB, respectivamente). El número de secuencias por sección de biopsia fue relativamente similar dentro de una misma biopsia, tanto en las secuencias TRA (Figura 10C), como en las TRB (Figura 10D), exceptuando la

562, que presentó valores muy variados en las cuatro secciones estudiadas (Anexos, Tabla suplementaria 2).

Figura 10. Riqueza observada en las distintas muestras de cada biopsia. (A), (B) Curva de rarefacción de cada biopsia en las secuencias TRA y TRB, en las que se muestra el número de clones distintos (riqueza) respecto al tamaño de la muestra (en número de *reads*). Las líneas discontinuas muestran la extrapolación a la muestra de mayor tamaño. (C), (D) Número de secuencias TRA CDR3nt, y TRB CDR3nt, en las distintas secciones (representadas por puntos) de las biopsias analizadas (las barras representan la media de cada biopsia).

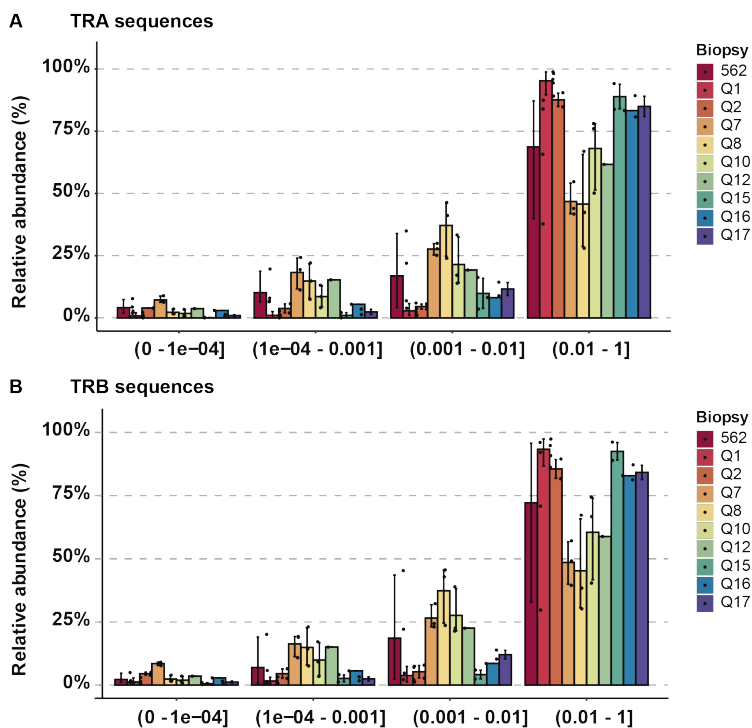
En segundo lugar, se miró la distribución de secuencias en base a su frecuencia en el repertorio. Se calculó la abundancia relativa (número de secuencias en un grupo,



dividido entre el total de secuencias en la muestra) de las secuencias agrupadas por cuatro grupos de frecuencia: 1 - 0.01; 0.01 - 0.001; 0.001 - 0.0001; y 0 - 0.0001. Los resultados se muestran por secciones agrupados por biopsia. Se obtuvieron datos muy similares en las secuencias TRA y en las TRB. En todas las biopsias menos en dos (Q7 y Q8) los clones con frecuencias de entre 1 y 0.01 ocupaban más del 50 % del

total, y más de un 75 % en las biopsias Q1, Q2, Q15, Q16 y Q17, tanto en las secuencias TRA (Figura 11A) como en las TRB (Figura 11B).

Figura 11. Distribución del repertorio por grupos de frecuencia y su abundancia relativa en la muestra. Se muestran las secuencias agrupadas en cuatro grupos en función de sus frecuencias (entre 1 y 0.01, entre 0.01 y 0.001, entre 0.001 y 0.0001 y entre 0 y 0.0001) y su abundancia relativa en la muestra, en porcentaje. Los resultados se muestran por secciones de



cada biopsia (puntos) agrupados por biopsia (barras). Se obtuvieron datos muy similares en las secuencias TRA (A) y TRB (B). La mayoría de las muestras mostraron más de un 50 % del repertorio formado por secuencias con frecuencias entre 0.01 y 1. Análisis y gráfico realizado con Immunarch²⁸³.

La media del tamaño nucleotídico de las secuencias CDR3nt fue de 42 nt y de 44 nt, en las secuencias TRA y TRB, respectivamente (Figura 12A). La región N(D)N presentó, de media, un tamaño de 5 nt en las secuencias TRA y de 13 nt en las secuencias TRB (Figura 12B) (esperable debido a la región D que se encuentra en las secuencias TRB y no en las TRA). Las secuencias mostraron una distribución normal en base al tamaño del CDR3nt en todas las biopsias y tanto en las secuencias TRA como en las TRB (Figura 12C, Figura 12D).

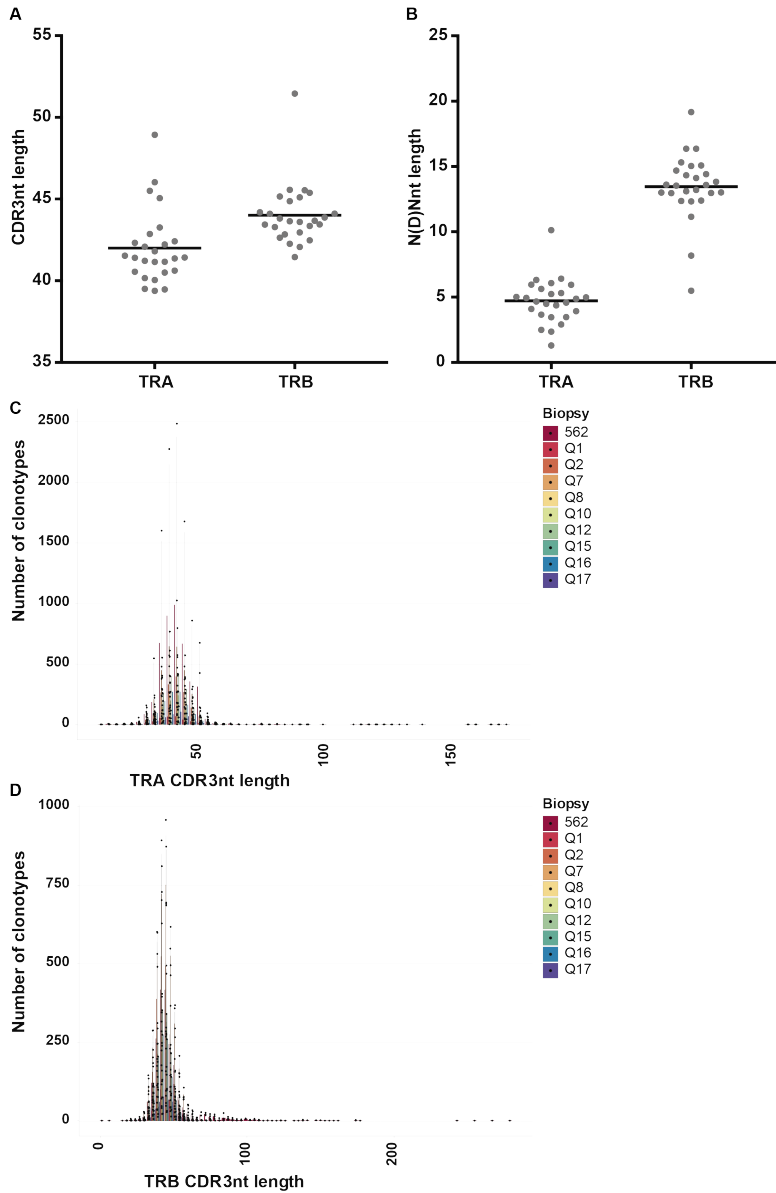


Figura 12. Tamaño de las secuencias nucleotídicas CDR3 de los T-TIL de los cultivos iniciales. (A) La media del tamaño CDR3nt de todas las biopsias fue de 42nt en las secuencias TRA y de 44nt en las TRB. (B) El tamaño del N(D)Nnt fue, de media, 5 nt en las secuencias TRA y de 13 nt en las TRB. (C), (D) Todas las biopsias mostraron una distribución normal en la distribución de las secuencias por tamaño, tanto en las secuencias TRA (C) como en las TRB (D).

Posteriormente, se estudiaron las propiedades bioquímicas (hidropatía, carga y polaridad) de las secuencias aminoacídicas del CDR3, usando los 5 aminoácidos centrales de esta región. Los valores obtenidos se ponderaron por la frecuencia de las secuencias y se normalizaron por el tamaño de la subregión utilizada. En conjunto, las medias de los valores obtenidos fueron parecidas entre las secuencias TRA y TRB. La media de los valores de hidropatía fue de -0.99 y -0.72 y la de los valores de polaridad de 0.56 y 0.51, en las secuencias TRA y TRB, respectivamente. En los valores de carga, la media obtenida fue de alrededor de 0 en ambos grupos.

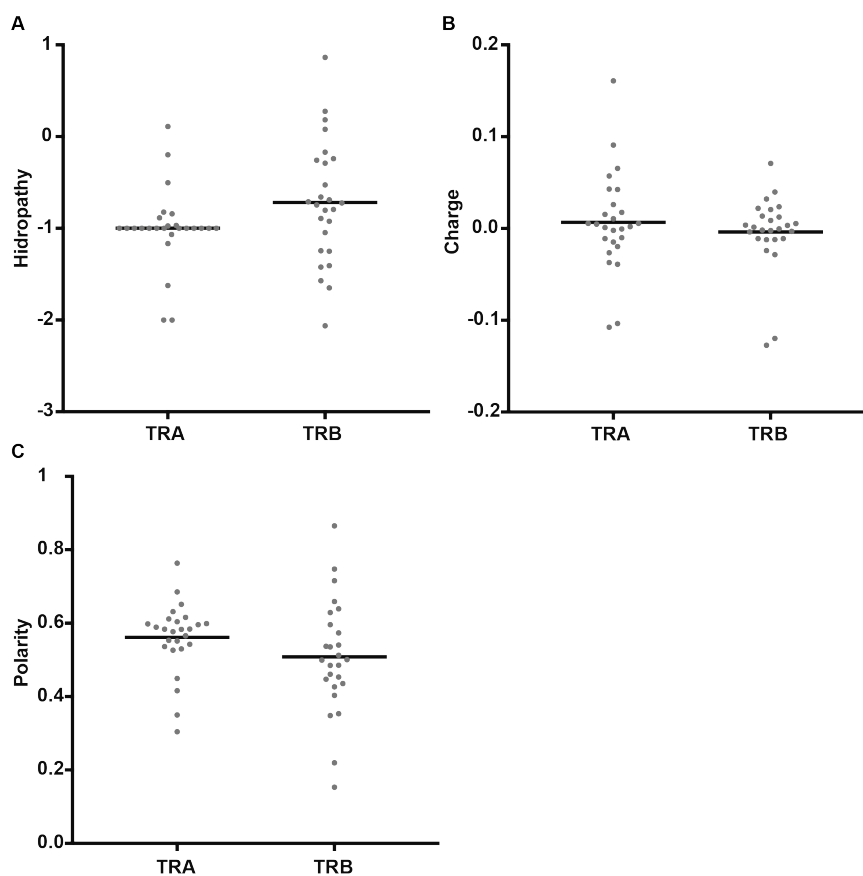


Figura 13. Propiedades bioquímicas de la región central de las secuencias CDR3 (5aa) de los T-TIL de los cultivos iniciales. (A) Valores de hidropatía obtenidos en las distintas muestras. Las medias obtenidas fueron de -0.99 y 0.72, en las secuencias TRA y TRB, respectivamente. (B) Valores de carga obtenidos en las distintas muestras. Las medias obtenidas fueron de alrededor de 0 en los grupos de secuencias TRA y TRB. (C) Valores de polaridad de las distintas muestras. Las medias obtenidas fueron de 0.56 y 0.51, en las secuencias TRA y TRB, respectivamente.

En último lugar, y dado que se observó dispersión en ciertas características del repertorio de TCR, se analizó si existía correlación con el fenotipo celular de los T-TIL. Para ello, se usaron los porcentajes de CD4+ y CD8+ obtenidos en los cultivos en la misma fecha que se recogieron las células para la extracción del ARN para la secuenciación del TCR. Se calcularon las correlaciones de Pearson entre los porcentajes CD4+, CD8+ y las ratios CD8/CD4 y los valores de tamaño del CDR3nt; tamaño de la región N(D)Nnt; hidropatía, carga y polaridad de la región 5-mer central del CDR3aa, tanto para las secuencias TRA como TRB.

Se observó una correlación significativa directa entre el porcentaje de T-TIL CD4+ y el tamaño del CDR3nt en las secuencias TRA ($p = 0.03$) (Figura 14A), así como una correlación inversa entre éstas mismas y el tamaño de la región N(D)Nnt en las secuencias TRB ($p = 0.03$) (Figura 14B). Estos datos sugerirían que los LT CD4+ presentan secuencias CDR3nt TRA más largas, pero regiones N(D)Nnt de las secuencias TRB más cortas. El resto de las propiedades de las secuencias TCR no mostraron ninguna correlación.

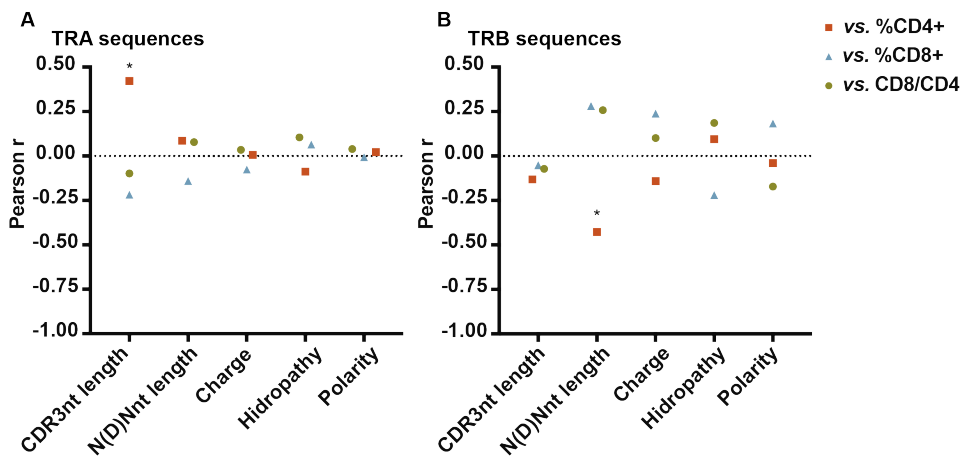


Figura 14. Correlaciones de Pearson obtenidas entre las características del repertorio de TCR de los T-TIL de los cultivos iniciales con los porcentajes de CD4+, CD8+ y la ratio CD8/CD4. (A) De las propiedades analizadas de las secuencias TRA, se observó una correlación directa significativa entre el tamaño del CDR3nt y el porcentaje de LT CD4+ ($p = 0.03$). (B) En las secuencias TRB, se observó una correlación inversa significativa entre el tamaño de la región N(D)N y el porcentaje de LT CD4+ ($p = 0.03$).

1.2.4. Los porcentajes de T-TIL CD4+ en los cultivos iniciales están relacionados de forma inversa con la diversidad del repertorio de TCR

A parte de las propiedades fisicoquímicas de las secuencias CDR3, ciertas medidas de análisis del repertorio pueden proveer información sobre la respuesta. Entre ellas, dos de las más utilizadas son el nivel de convergencia y la diversidad. El primero, también llamado nivel CR, es definido como el número promedio de secuencias nucleotídicas

distintas para un número concreto de secuencias aminoacídicas en una muestra. Un valor del nivel CR superior a 1, indicaría que, en promedio, hay más de una secuencia nucleotídica codificando para una misma secuencia aminoacídica, por ello, un valor del nivel CR elevado podría indicar cierta selección de clones con un CDR3aa concreto, codificados por secuencias CDR3nt ligeramente distintas. Por otro lado, la diversidad permite conocer si los linfocitos infiltrantes son muy diversos – en base a sus TCR – o si, por el contrario, existe una alta clonalidad que indicaría la presencia de expansiones oligoclonales. Mientras la diversidad indica si ciertas secuencias CDR3aa están aumentadas, independientemente de su origen, el nivel CR da información sobre la existencia de muchas secuencias CDR3aa con orígenes, independientemente de su abundancia.

Se estudió el nivel CR en los T-TIL de los cultivos iniciales, tanto en las secciones por separado, como en las biopsias. Para ello, se consideraron todos los clones de varias secciones de una biopsia y se estudió el nivel de convergencia. Los resultados obtenidos fueron similares, con una media de 1.09 y 1.05 en el análisis por sección, en los grupos de secuencias TRA y TRB, respectivamente y de 1.1 en ambos grupos en el análisis por biopsia (Figura 15). No se observó una alta dispersión a excepción de las muestras de la biopsia 562 en los grupos de secuencias TRA, tanto en su valor conjunto en la biopsia como en las cuatro secciones. Esto podría deberse a que esta biopsia se secuenció de forma independiente y aislada al resto y, en consecuencia, se obtuvo un mayor número de *reads*. Sin embargo, muchas de estas secuencias codifican para la misma secuencia aminoacídica, dando lugar a este alto nivel de CR. No se encontró correlación entre los porcentajes de LT CD4+, CD8+ o de la ratio CD8/CD4 con el nivel de CR.

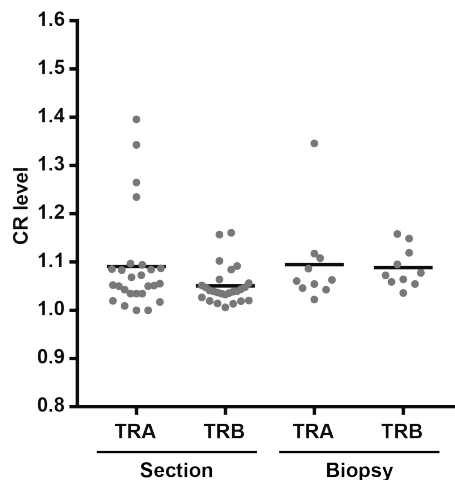


Figura 15. Nivel CR de las secuencias de los T-TIL de los cultivos iniciales. Se muestran los valores del nivel CR en las secuencias TRA y TRB. La media obtenida fue similar en ambos grupos y tanto por sección como por biopsia (1.09 y 1.05, en las secuencias TRA y TRB, respectivamente, por sección, y 1.1 en ambas, por biopsia).

En cuanto al análisis de la diversidad del repertorio de TCR en los T-TIL de los cultivos iniciales, se usó el índice de Shannon-Wiener normalizado (nS-W), definido anteriormente (ver página 64) y que combina la riqueza con la abundancia. Puesto a que la secuenciación se hizo en paralelo para las secuencias TRA y TRB, la diversidad también se usó como control, analizando si se obtenían índices similares en los dos grupos de secuencias de cada muestra.

Los índices de diversidad obtenidos en las secuencias TRA y TRB se correlacionaron significativamente ($p < 0.0001$), validando los datos obtenidos de las secuenciaciones pese a haber sido realizadas en paralelo (Figura 16A). La media de los índices de diversidad en las secuencias TRA y TRB fue muy similar, de 0.44 y 0.47, respectivamente (Figura 16B). Por otro lado, se observó una gran dispersión, indicando diversidades muy dispares entre distintas muestras. Además, salvo en ciertas biopsias como la Q8 o la Q7 – que mostraron altos índices de diversidad en todas sus secciones y que fueron las biopsias con secuencias con frecuencias entre 0.01 y 1 ocupando menos del 50 % (Figura 11) – la mayoría de las biopsias mostraron índices de diversidad distintos en las distintas secciones analizadas, demostrando, de nuevo, la heterogeneidad de los T-TIL dentro de una misma biopsia.

Teniendo en cuenta esta dispersión, se correlacionaron los índices de diversidad obtenidos con el fenotipo de los T-TIL en cultivo, para ver si existía alguna relación, tal y como se había hecho anteriormente con el resto de las propiedades del repertorio de TCR (). Se observó una correlación inversa significativa entre los porcentajes de LT CD4+ en los cultivos iniciales con el índice de diversidad nS-W ($p = 0.035$ y $p = 0.004$, en las secuencias TRA y TRB, respectivamente). Por el contrario, el porcentaje de LT CD8+ no se correlacionó significativamente con la diversidad del repertorio, a pesar de que se observó cierta tendencia a una mayor diversidad a mayor porcentaje de LT CD8+. Las ratios CD8/CD4 no se correlacionaron con la diversidad de ningún modo.

En conjunto, los datos mostraron que tanto los porcentajes de LT CD4+ como de LT CD8+ en los cultivos de T-TIL se correlacionaron con ciertas características del fenotipo y del repertorio de TCR, de forma distinta y por separado. Sin embargo, las ratios entre estas dos poblaciones no se correlacionaron con ninguna otra propiedad estudiada.

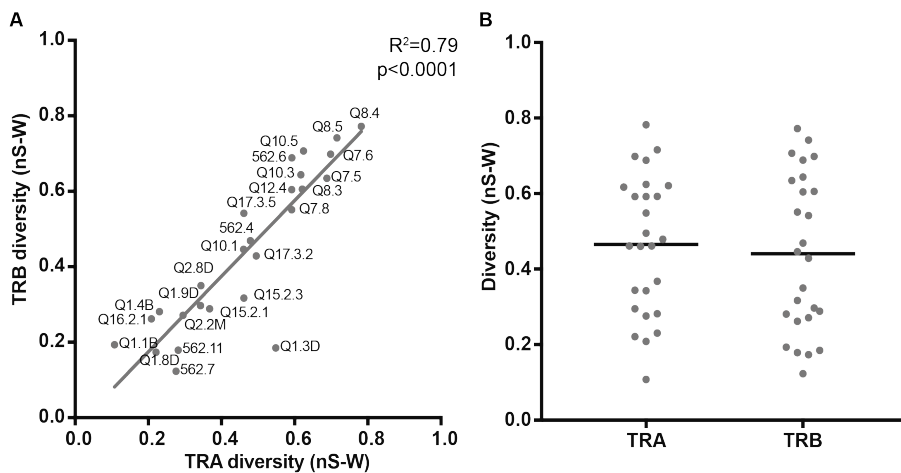


Figura 16. Diversidad del repertorio de TCR de los T-TIL de los cultivos iniciales. (A) Correlación de los índices de diversidad de nS-W, entre las secuencias TRA y TRB en las distintas secciones de las biopsias analizadas. Se observó una correlación significativa entre ambos grupos de secuencias ($p<0.0001$). (D) Dispersión y media de los índices de diversidad de nS-W obtenidos en las secuencias TRA y TRB.

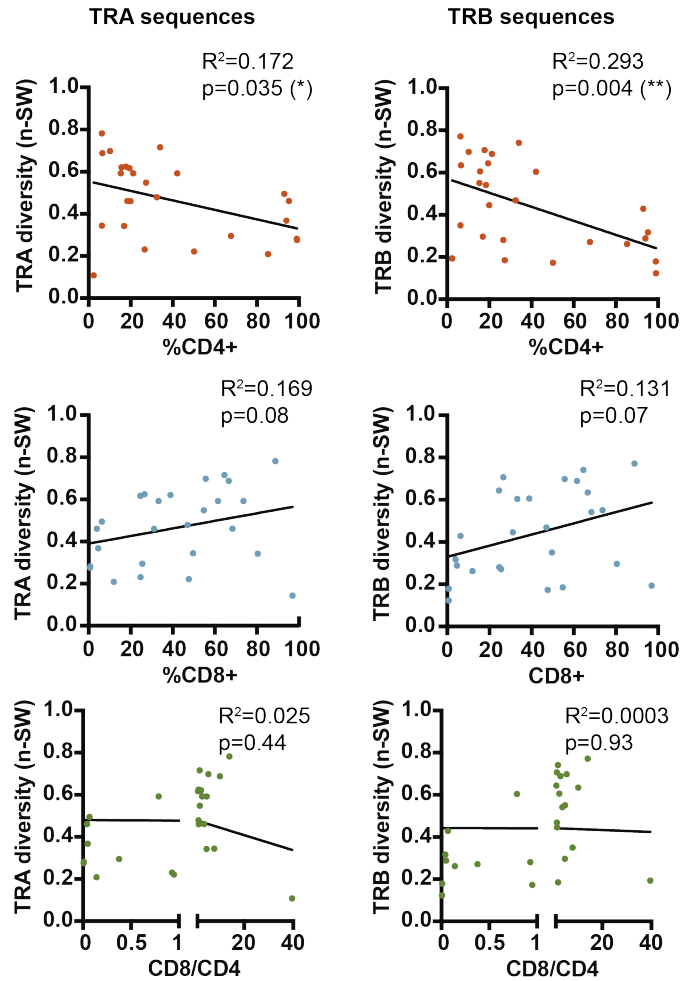


Figura 17. Correlación de la diversidad con los porcentajes de T-TIL CD4+, CD8+ y la ratio CD8/CD4 en los cultivos iniciales. Se observó una correlación significativa entre el porcentaje de linfocitos T CD4+ con los índices de diversidad de nS-W, tanto en las secuencias TRA como en las TRB.

1.4. Discusión

En este capítulo se ha realizado un análisis inicial de caracterización de T-TIL en tumores de CMLA, CMLB y CMTN. Para ello, se analizó la presencia de LT CD4+ y CD8+ en los cultivos primarios de T-TIL, así como de citocinas secretadas en los cultivos. Seguidamente, se realizó un estudio de caracterización del TCR en estas muestras iniciales, para determinar si existen diferencias en los distintos subtipos.

La primera observación fue una alta heterogeneidad en la distribución espacial de la biopsia, es decir, dependiendo de la sección del tumor analizada, se puede observar un porcentaje distinto de LT CD3+. Esto ha sido demostrado anteriormente en varios estudios realizados por IHC en tumores de mama³¹⁹⁻³²¹. La heterogeneidad fue aún más evidente cuando se analizan LT por sus poblaciones. Sin embargo, algunos de estos estudios han demostrado una mayor homogeneidad cuando se comparan múltiples biopsias de un mismo tumor³²¹. Esto indicaría que el abordaje experimental realizado ha permitido obtener resultados representativos del tumor.

Con tal de evaluar si un mayor infiltrado en ciertas zonas podía estar asociado a un mayor porcentaje de uno u otro subtipo de LT, se realizaron asociaciones de los porcentajes de CD3+ con las ratios CD8/CD4, tanto en los inicios como durante todo el cultivo. No se encontraron asociaciones en los cultivos iniciales, lo cual indicaría que un alto porcentaje de LT CD3+ puede asociarse tanto a un alto infiltrado de LT CD4+ como de LT CD8+. Sin embargo, se observó una correlación inversa entre los cultivos con mayor número de CD8+ que de CD4+ (ratio CD8/CD4>1) cuando se utilizaron los datos de todas las semanas de cultivo, y no solamente las del inicio. Esto podría explicarse por la naturaleza proliferativa de los LT CD4+, la cual se intensifica tras semanas de cultivo. Es decir, incluso en aquellos cultivos donde el porcentaje de LT CD8+ era mayor, las células CD4+ seguían ocupando altos porcentajes, indicando una mayor proliferación.

Se estudiaron los patrones de citocinas en los cultivos iniciales (días 5, 10, 15 y 20) y se correlacionaron con los porcentajes de subpoblaciones de LT. De todas las citocinas relacionadas con la citotoxicidad, solamente la granulicina y la granzima A se correlacionaron positivamente con el porcentaje de LT CD8+ en los cultivos. Sin embargo, se encontró una correlación inversa entre el porcentaje de LT CD4+ y la cantidad de sFasL, granulicina, granzima A, granzima B y perforina. Esto indicaría que la citotoxicidad se ve disminuida por la cantidad de LT CD4+, a pesar de que son capaces de generar o incrementar la respuesta citotóxica en ciertas circunstancias. El porcentaje de LT CD4+ tampoco se correlacionó con las citocinas definitorias de patrones de Th. Esto puede explicarse por la variedad de distintos tipos de células CD4+ y los diversos patrones de citocinas producidas, lo cual dificulta la predominancia de un perfil concreto.

Se observó una correlación negativa entre la cantidad de IL-17 y de LT CD8+. El papel de la IL-17 en cáncer ha sido muy estudiado debido a su plasticidad³²²⁻³²⁷. Se ha descrito que la IL-17 puede promover la proliferación tumoral e inducir angiogénesis mediante la estimulación de fibroblastos que, a su vez, incrementan la producción de VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular)³²⁸. En CM, también se ha reportado un incremento de la IL-17^{322,329} y su presencia se ha asociado al reclutamiento de neutrófilos favorecedores de la progresión tumoral, es decir, a un peor pronóstico³³⁰. Recientemente, estudios en ratón en el contexto del cáncer colorrectal, se ha descrito que la IL-17 inhibe la producción de las quimiocinas CXCL9 y CXCL10 por parte de las células tumorales, disminuyendo el reclutamiento de LT CD8+³³¹. Esto podría ser una explicación a la correlación inversa observada entre LT CD8+ y la cantidad de IL-17, aunque debería ser estudiado en mayor profundidad. Teniendo esto en cuenta, nuestros datos sugieren una polarización entre LT CD8+ y Th17, por lo que el uso de la ratio CD8+/Th17 podría ser útil, como en el caso de la ratio CD8+/Treg.

Por otro lado, se estudiaron características de las secuencias CDR3 del TCR, así como del repertorio de TCR en conjunto. No se observaron diferencias en las propiedades analizadas dependiendo de la etiología de los tumores (CMLA, CMLB y CMTN). En cuanto a las propiedades fisicoquímicas, ninguna de las características que se estudiaron se pudieron relacionar con los porcentajes de LT CD4+ o CD8+. Un estudio anterior realizado con LT periféricos mostró que las células CD8+ presentan secuencias CDR3aa más largas³³². Otro estudio reveló diferencias en el promedio de la carga de las secuencias CDR3aa, debido a una mayor frecuencia en el uso de aminoácidos con cadenas laterales de carga negativa en las poblaciones CD8+³³³. Estas diferencias no se observaron en el caso de los T-TIL iniciales, aunque hay que tener en cuenta que los TIL son una población sesgada y los resultados en periferia no son comparables.

En un estudio anterior en CM se observó un nivel de convergencia mayor en secuencias compartidas entre pacientes y ratones que desarrollaban espontáneamente CM³³⁴. Esto podría sugerir que dichas secuencias se seleccionan debido a la enfermedad. Por este motivo, estudiamos el nivel de CR en nuestras muestras y se observaron valores muy similares, tanto en el análisis por separado de cada sección como en el análisis de una misma biopsia. Por ello, se concluyó que los porcentajes de LT CD4+ y CD8+ no estaban asociados con esta propiedad.

Sin embargo, en cuanto a la diversidad, se correlacionaron los niveles de diversidad con la presencia de LT CD4+, i. e., a mayor porcentaje de estas células en el cultivo se observaron índices de diversidad más bajos, tanto en las secuencias TRA como TRB. Estudios previos han demostrado una mayor diversidad de LT CD4+ en periferia, comparado con la de los LT CD8+^{332,333}. Teniendo en cuenta nuestros resultados, esta discrepancia con la literatura puede ser explicada a partir dos hipótesis:

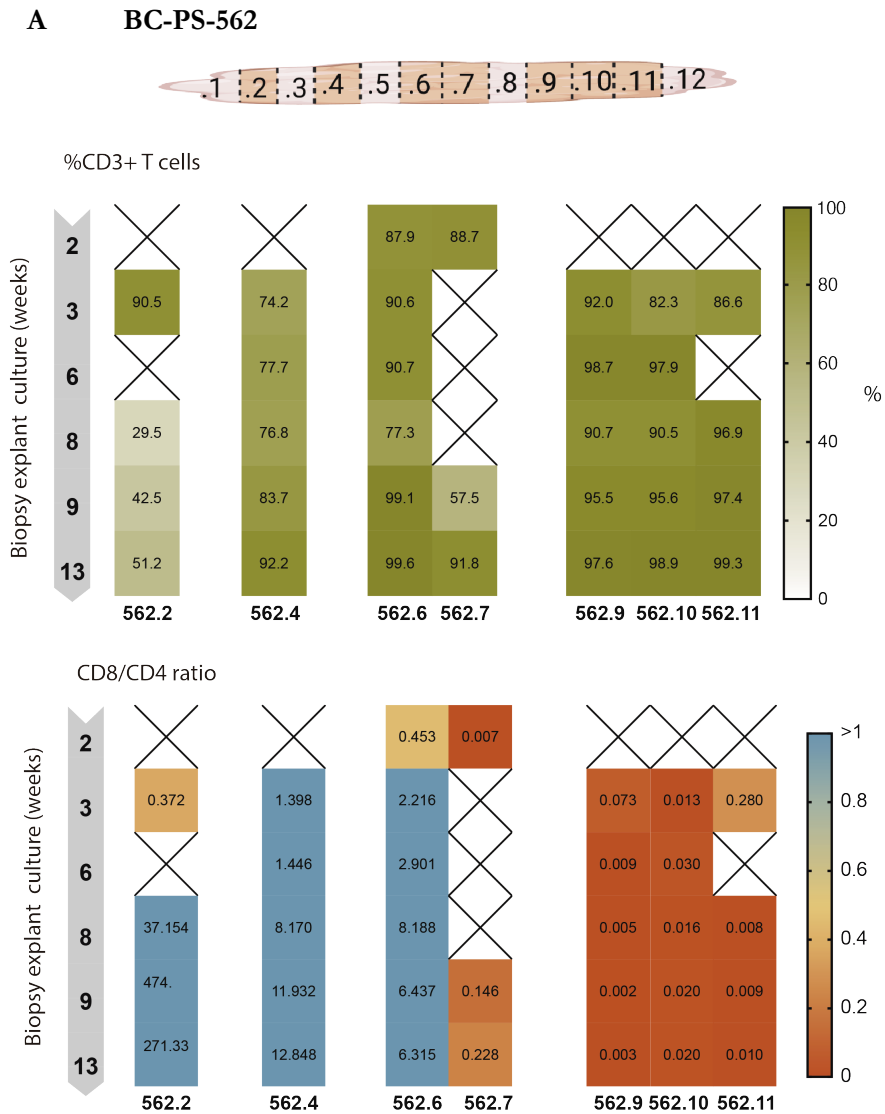
Capítulo I. Discusión

por un lado, los T-TIL CD4+ tienen mayor capacidad proliferativa en los cultivos, induciendo una pérdida de la diversidad global. Por otro, que dichas células son el resultado de expansiones clonales de reconocimiento *in situ* en el tumor.

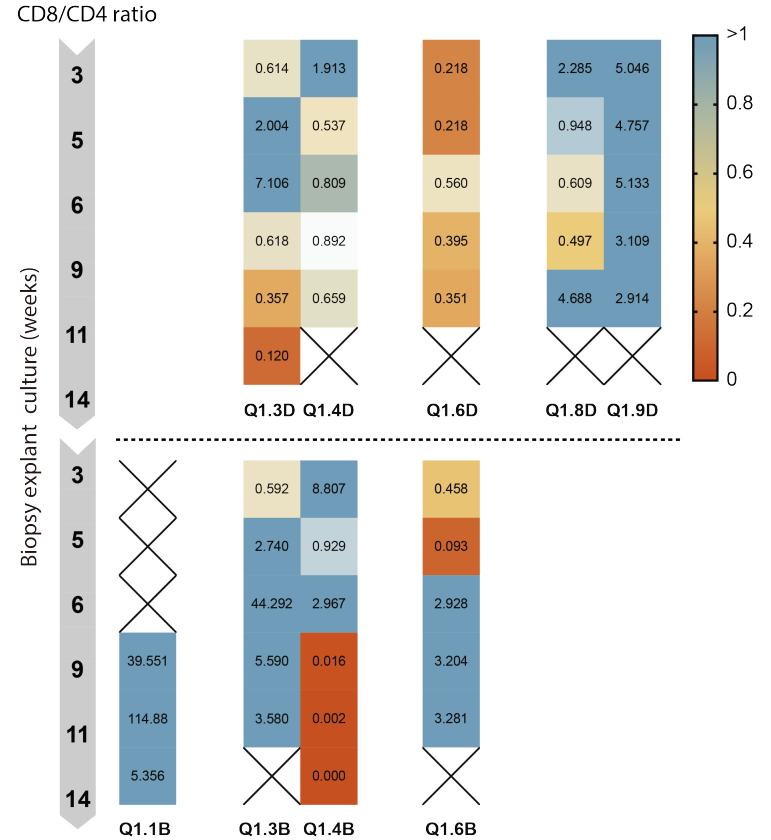
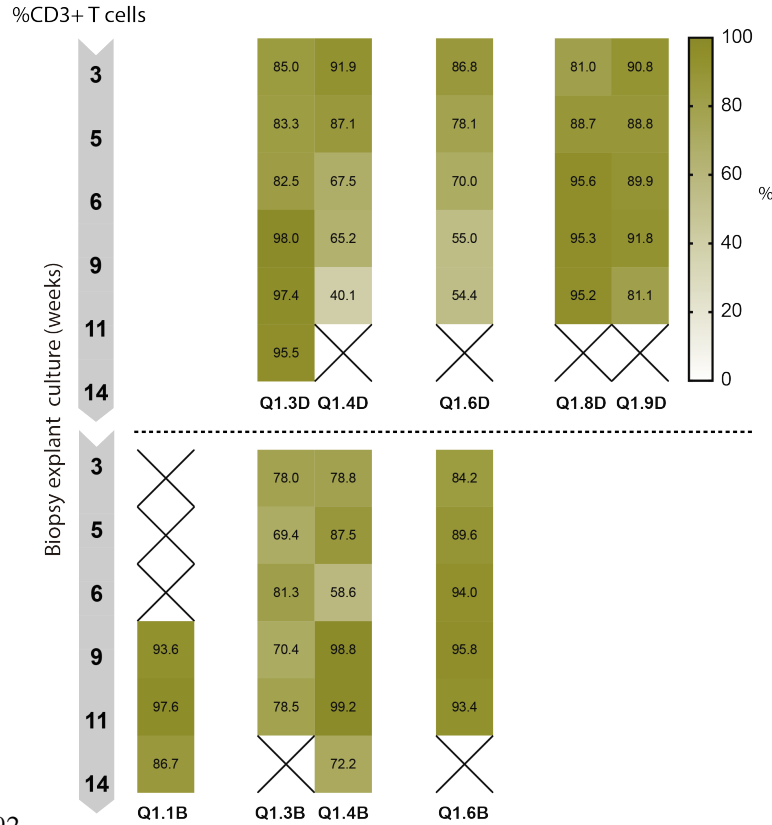
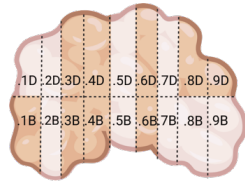
Es importante tener en cuenta que el estudio realizado en este primer capítulo no se ha llevado a cabo con subpoblaciones purificadas, es decir, las correlaciones se realizaron entre los porcentajes de LT CD4+ y CD8+ estudiados por citometría con las distintas propiedades globales obtenidas de cada cultivo. Por ello, ciertas correlaciones podrían no ser significativas debido a la metodología. Sin embargo, las diferencias encontradas nos llevaron a sospechar que sí podía haber diferencias entre subpoblaciones, aunque era necesario evaluarlo en linfocitos purificados para determinar si estas eran intrínsecas al subtipo o bien venían dadas por una posible respuesta anti-tumoral.

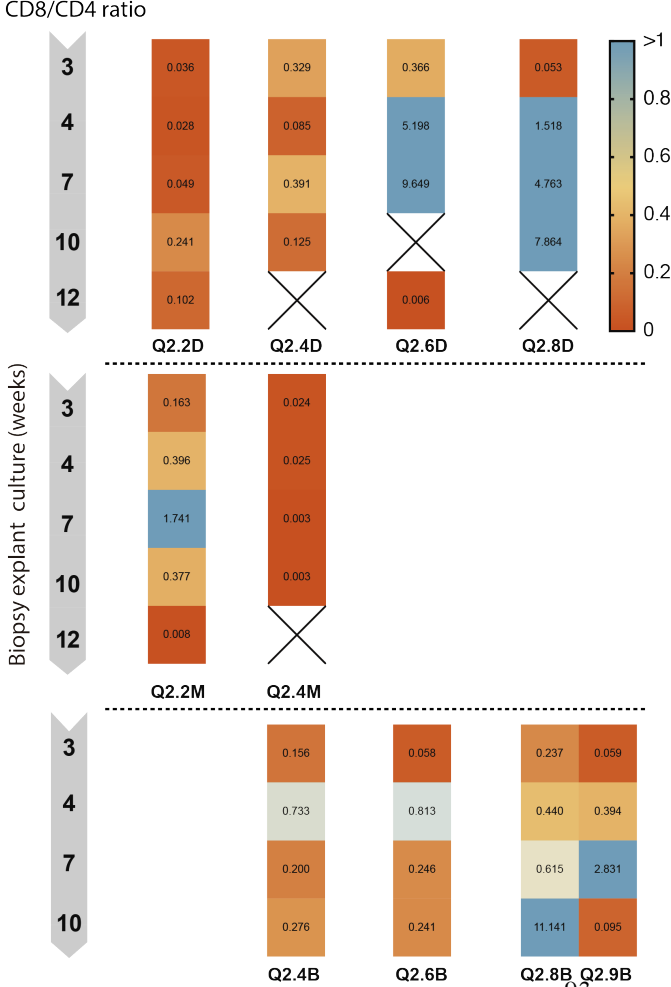
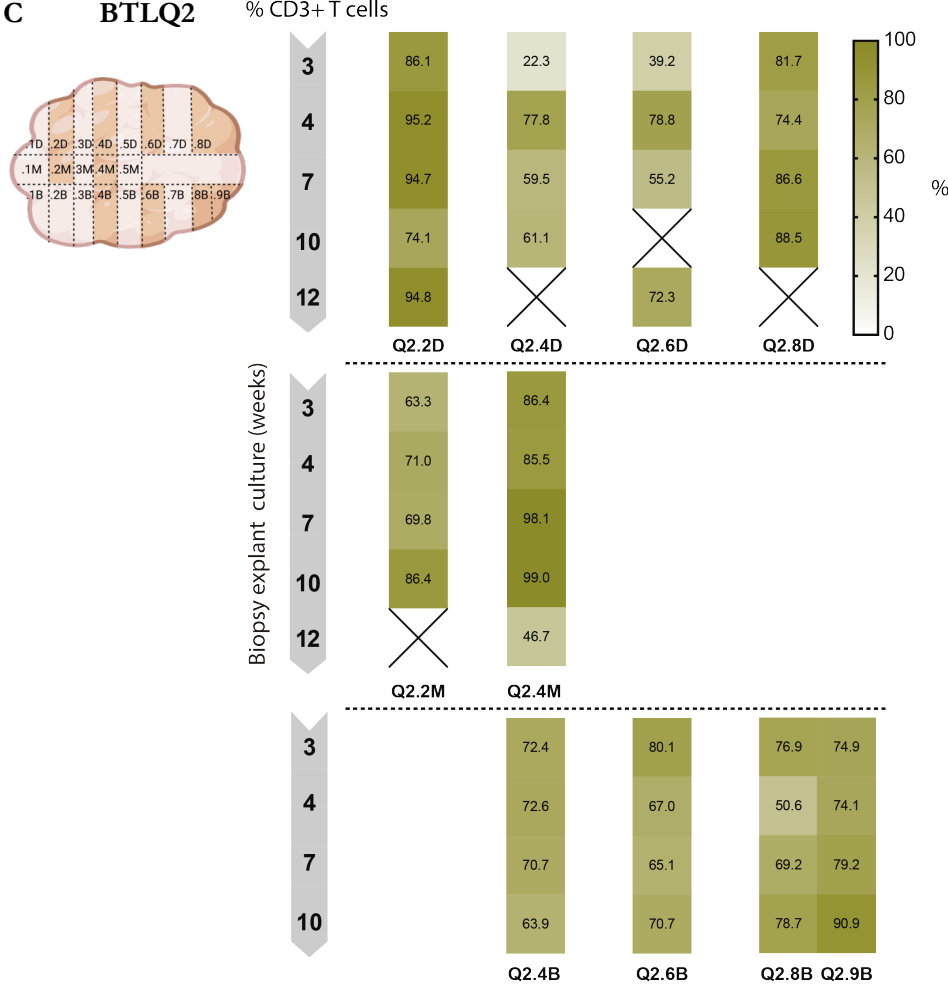
1.3. Figuras suplementarias

Figura suplementaria 1. Porcentajes de linfocitos CD3+ y ratios CD8/CD4 en las biopsias y secciones analizadas en las semanas de cultivo. Porcentajes de CD3+ (en verde) y ratios CD4/CD8 (de rojo a azul, en rojo valores CD8/CD4<1 y en azul valores CD8/CD4>1) obtenidos por citometría de flujo. Se muestran la semana en la que se realizaron las tinciones y las distintas secciones de cada biopsia estudiada, por orden: (A) 562, (B) Q1, (C) Q2, (D) Q7, (E) Q8, (F) Q10, (G) Q12, (H) Q14, (I) Q15, (J) Q16 y (K) Q17. Los recuadros con una X indican que no se pudo realizar tinción de esa sección en esa fecha.



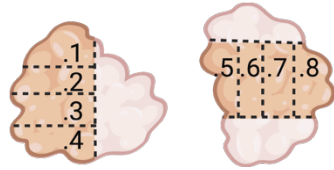
B BTLQ1



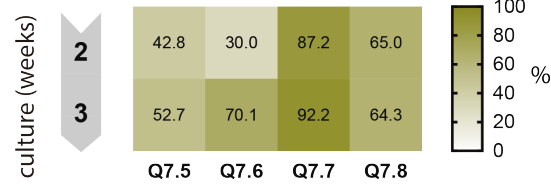


Capítulo I. Figuras suplementarias

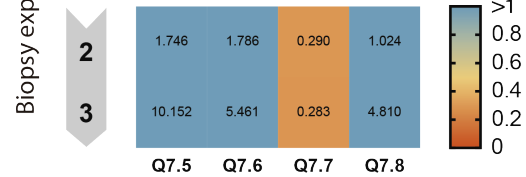
D BTLQ7



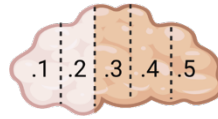
% CD3+ T cells



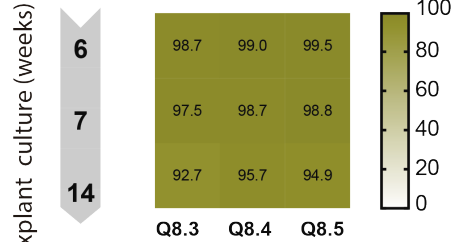
CD8/CD4 ratio



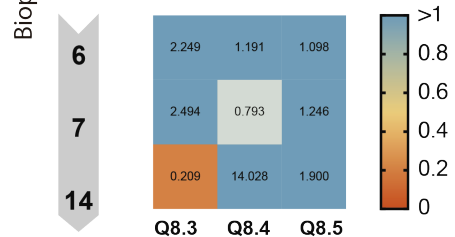
E BTLQ8



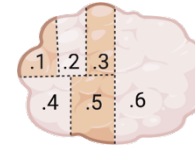
% CD3+ T cells



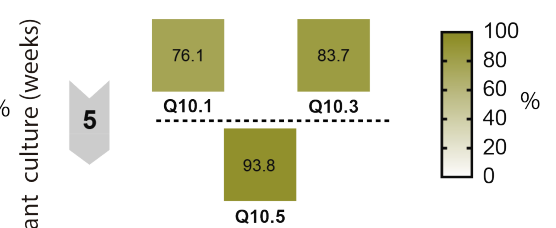
CD8/CD4 ratio



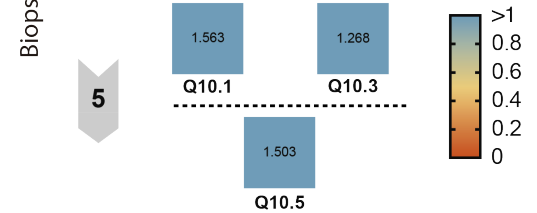
F BTLQ10



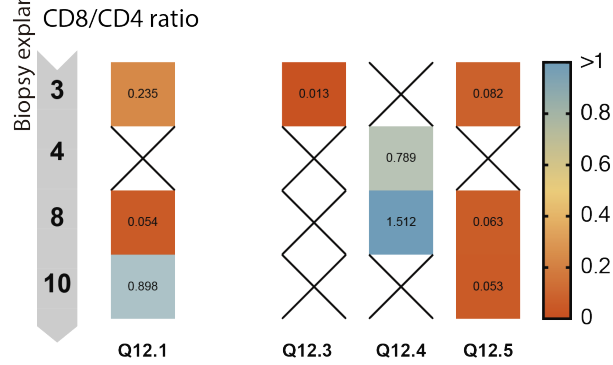
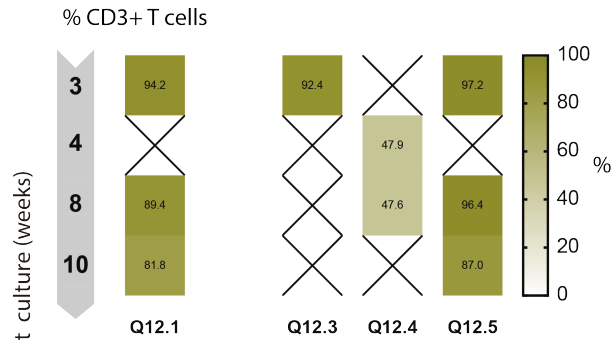
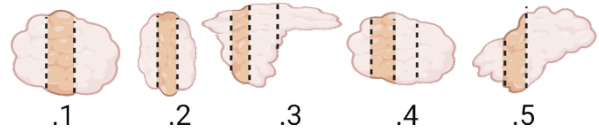
% CD3+ T cells



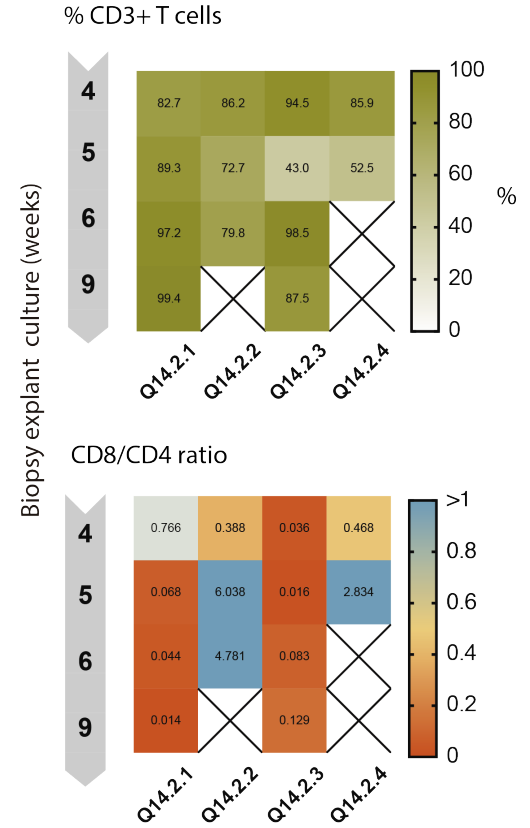
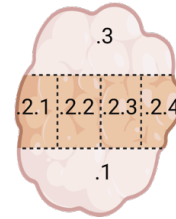
CD8/CD4 ratio



G BTLQ12

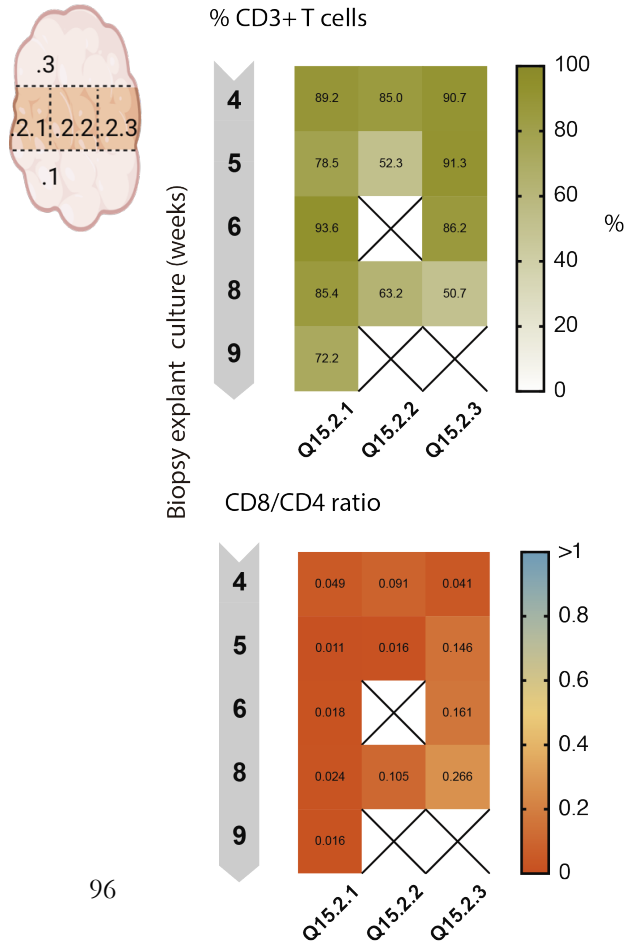


H BTLQ14

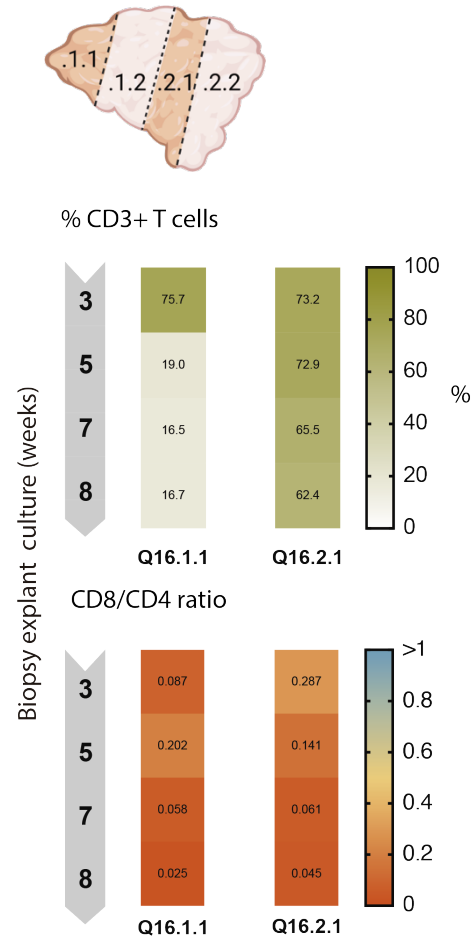


Capítulo I. Figuras suplementarias

I BTLQ15



J BTLQ16



K BTLQ17

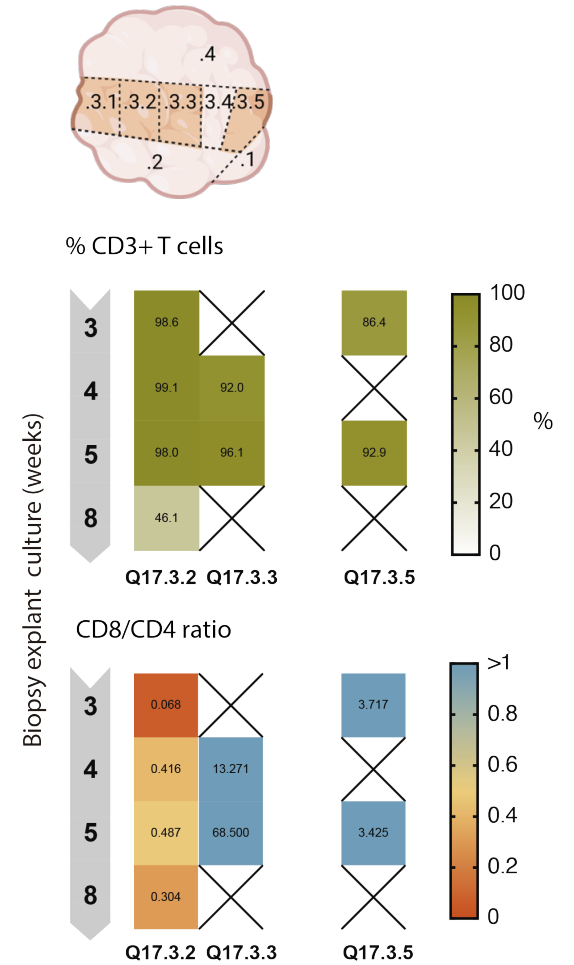


Figura suplementaria 2. Correlación entre las moléculas secretadas en el sobrenadante y el porcentaje de T-TIL CD4+ en los cultivos iniciales. Se estudió la correlación, mediante regresiones lineales, de la cantidad de moléculas secretadas (en pg/ml) con los porcentajes de T-TIL CD4+ en el cultivo en la misma fecha que la recogida de sobrenadante. Se observó una correlación inversa entre el porcentaje de T-TIL CD4+ y la cantidad de sFasL ($p = 0.0006$), granulicina ($p < 0,0001$), granzima A ($p = 0.001$), granzima B ($p = 0.0098$) y perforina ($p = 0.0026$).

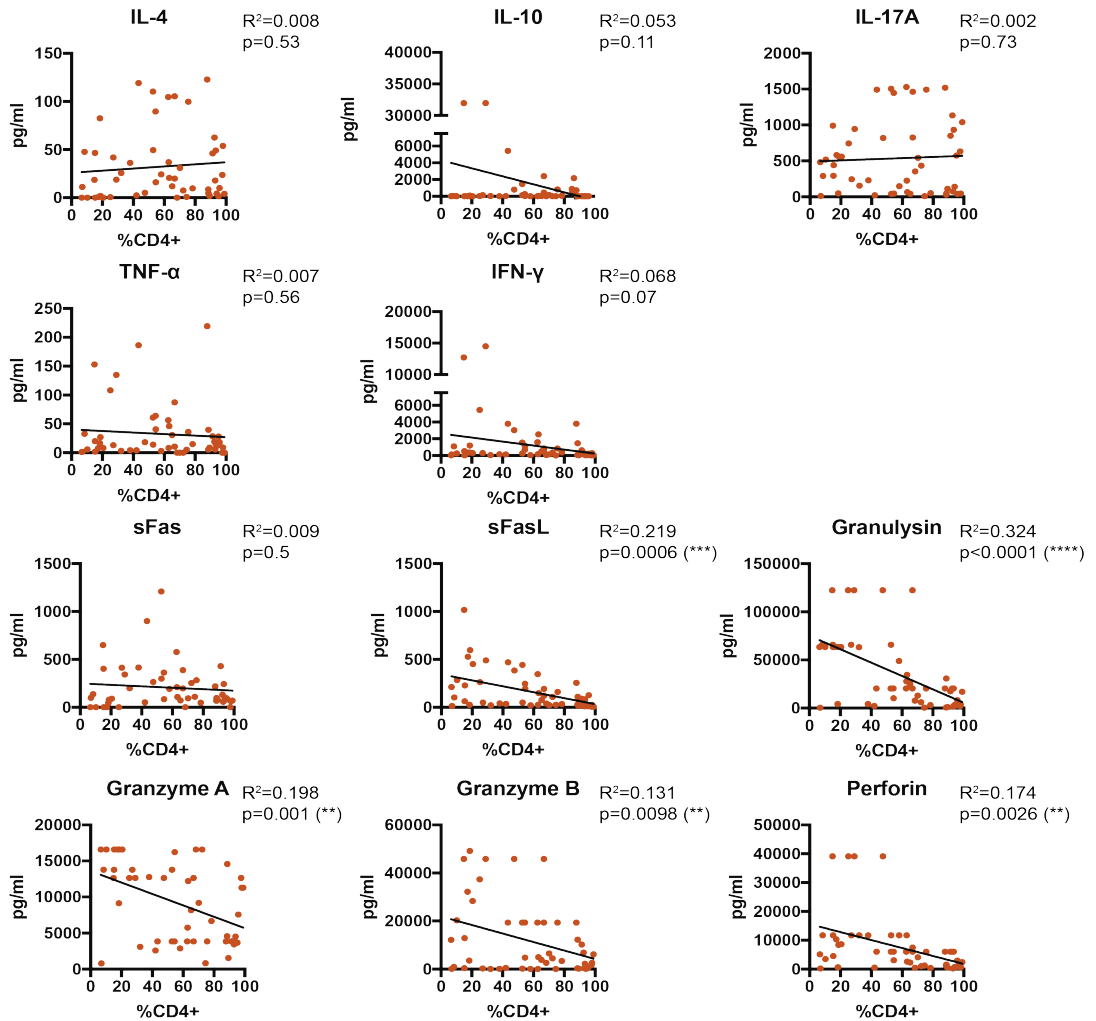


Figura suplementaria 3. Correlación entre las moléculas secretadas en el sobrenadante y el porcentaje de T-TIL CD8+ en los cultivos iniciales. Se estudió la correlación, mediante regresiones lineales, de la cantidad de moléculas secretadas (en pg/ml) con los porcentajes de T-TIL CD8+ en el cultivo en la misma fecha que la recogida de sobrenadante. Se observó una correlación inversa entre el porcentaje de T-TIL CD8+ y la cantidad de IL-17 ($p = 0.018$), así como una correlación directa con la producción de granzulina ($p = 0.025$) y granzima A ($p = 0.029$).

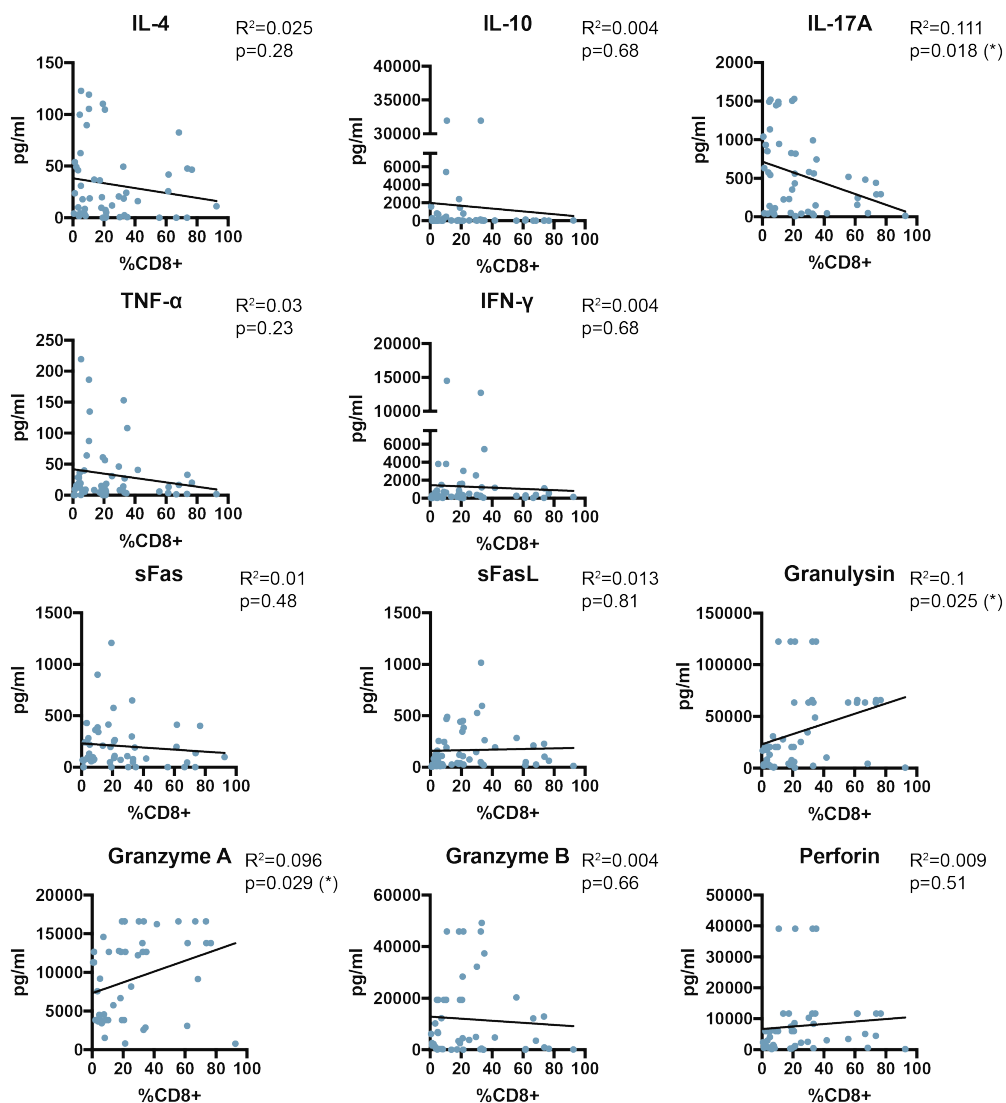
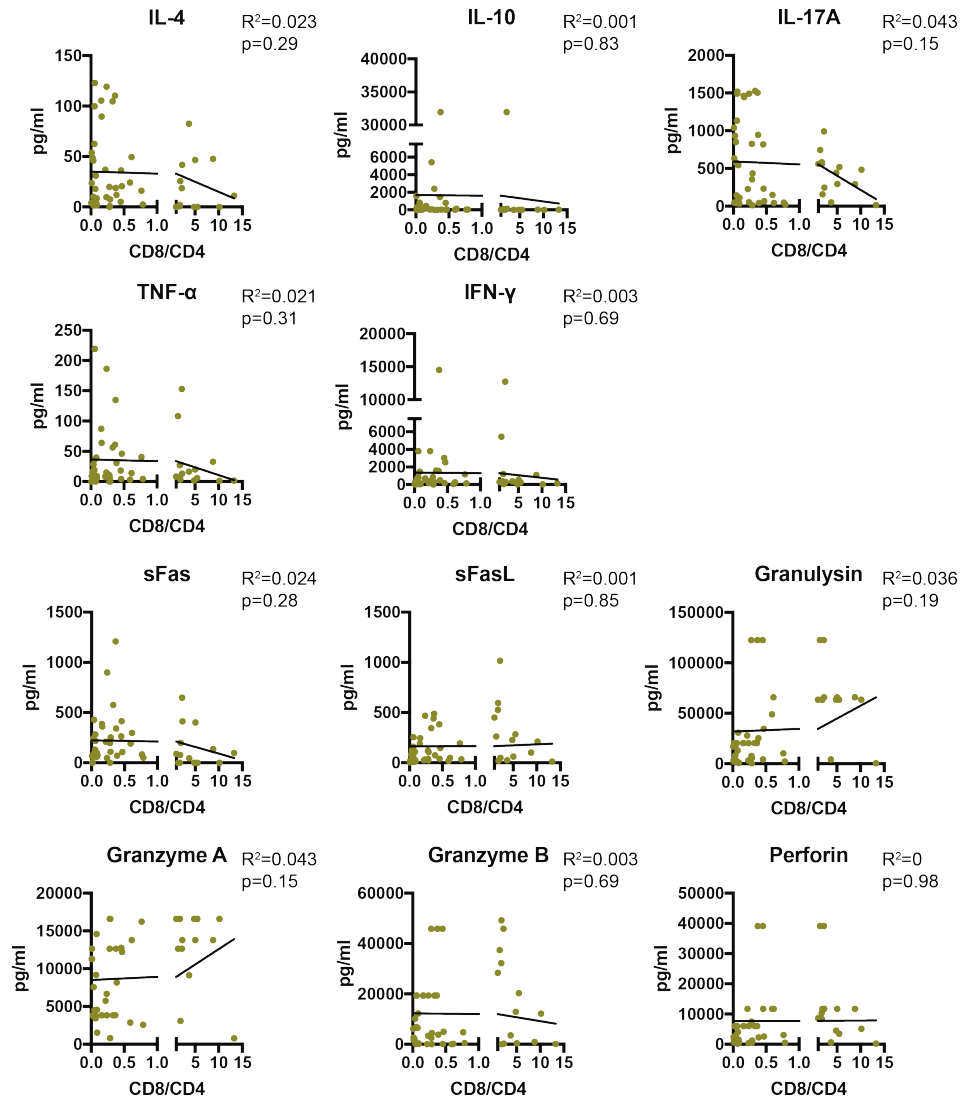


Figura suplementaria 4. Correlación entre las moléculas secretadas en el sobrenadante y la ratio CD8/CD4 en los cultivos iniciales. Se estudió la correlación, mediante regresiones lineales, de la cantidad de moléculas secretadas (en pg/ml) con las ratios CD8/CD4 en el cultivo en la misma fecha que la recogida de sobrenadante. No se observó ninguna correlación.



Capítulo II. Estudio de las diferencias en el repertorio de TCR de las subpoblaciones CD4+ y CD8+ de los T-TIL

2.1. Antecedentes

Pese a que varios estudios sobre el repertorio de TCR evidencian su valor, existen incongruencias en la literatura. Las diferencias encontradas en distintos trabajos podrían, en parte, venir dadas por diferencias en los subtipos celulares. Los resultados descritos en el capítulo anterior mostraron que un mayor porcentaje de T-TIL CD4+ o CD8+ en las muestras de cultivos iniciales estaba asociado a ciertas características del TCR. Por este motivo, se decidió continuar el estudio de los T-TIL separando las subpoblaciones CD4+ y CD8+ para estudiarlas con mayor profundidad, excluyendo la biopsia 562, por dos motivos: en primer lugar, dicha biopsia era una *core* biopsia (extraída en paralelo a la biopsia usada para el diagnóstico) y no una biopsia obtenida durante la cirugía de las pacientes; en segundo, porque las expansiones de células T de esta biopsia se habían realizado siguiendo una metodología distinta. Por consiguiente, la continuación del estudio consistió en el análisis de las diferencias en el repertorio de TCR de LT CD4+ y CD8+ expandidos *in vitro*, usando el mismo método y en todas aquellas biopsias de las que se pudo obtener una cantidad suficiente de dichas subpoblaciones purificadas.

Las diferencias fisicoquímicas del CDR3 podrían ser intrínsecas a los subtipos celulares debido a las distintas moléculas de MHC a las que reconocen y, en consecuencia, a los péptidos que presentan. Por ello, se ha estudiado: el tamaño del CDR3nt, tanto entero como de su región central N(D)Nnt; y las propiedades bioquímicas de las secuencias aminoacídicas. Por otro lado, se podrían dar diferencias no ligadas al tipo de HLA, sino a la presencia o ausencia de una activación y posterior expansión. Este tipo de diferencias, pueden observarse en el estudio global del repertorio más que en las propiedades del CDR3. Por ello, se ha estudiado el nivel de convergencia – esto es la media del número de secuencias CDR3nt distintas codificando para una misma secuencia CDR3aa –, la diversidad y la presencia de secuencias públicas.

En estudios periféricos se han descrito ciertas diferencias entre las subpoblaciones CD4+ y CD8+. En concreto, en un estudio realizado por Hou et al.³³⁵ se encontraron secuencias CDR3nt más largas en los LT CD8+, tanto en el compartimento naïve como de memoria. Al mismo tiempo, las propiedades bioquímicas de los aminoácidos que componen el CDR3, también podrían estar relacionadas con el subtipo celular. En un estudio realizado por Li et al.³³⁶ se describió un mayor uso de lisina y arginina (con cadenas laterales de carga positiva) en la región CDR3aa de los LT CD4+ periféricos. Por el contrario, los LT CD8+ presentaban una mayor frecuencia de uso de ácido aspártico (con cadena lateral de carga negativa)³³⁶.

Estudios previos han descrito una relación del nivel de convergencia con la cantidad de TCR públicos en periferia³³⁷ y en cáncer de mama³³⁴. Además, se ha descrito que el nivel de convergencia puede usarse como predictor de respuesta a terapia con anti-

Capítulo II. Antecedentes

CTLA-4 en distintos tipos de cáncer³³⁸. Esto podría sugerir que un mayor nivel de convergencia es el responsable de una selección de ciertos clones y, por lo tanto, de reconocimiento por parte de los LT.

En periferia, se ha demostrado una mayor diversidad de LT CD4+ comparado con los CD8+^{336,339}. Como es lógico, la diversidad en el compartimento de LT de memoria es menor que el de LT naïve, aunque la diversidad es mayor en las células CD4+ en ambos casos³³⁵.

En último lugar, se ha analizado la similitud de secuencias entre biopsias mediante el número de *clusters* generados por motivos, es decir, de secuencias idénticas o casi idénticas más cortas (de pocos aminoácidos), dentro de las secuencias CDR3aa. Esto ha sido muy poco investigado en distintos subtipos de células T, así como en CM.

Es importante tener en cuenta que este estudio se ha realizado con T-TIL expandidos *in vitro* que podrían alterar el repertorio mediante la selección de ciertos clones o por una distinta capacidad proliferativa. De hecho, en estudios con LT periféricos, se ha demostrado esta afirmación³⁴⁰. Por otro lado, Poschke et al.³⁴¹ describieron que una pérdida de la diversidad en TIL expandidos *ex vivo* (con anti-CD3 e IL-2) procedentes de melanoma y adenocarcinoma ductal. Por ello, se ha incluido el estudio del repertorio de TCR usando PBMCs de donantes sanos y expandidos mediante la misma metodología. Los resultados se han comparado entre subtipos de LT CD4+ y LT CD8+, tanto antes como después de las expansiones.

En resumen, los distintos subtipos de LT podrían presentar diferencias en sus TCR y, además, varios factores podrían condicionar la presencia y posterior activación, expansión y mantenimiento de éstos de forma diferencial. Dado que estas diferencias podrían verse reflejadas en sus repertorios de TCR, se han analizado las propiedades anteriormente descritas.

2.2. Resultados

Parte 1

La primera parte de este trabajo se centró en el estudio de las propiedades de las secuencias CDR3 y del repertorio previamente caracterizadas en T-TIL iniciales en T-TIL CD4+ y CD8+ expandidos. Se realizó un estudio comparativo entre estas dos subpoblaciones con el fin de determinar si existen diferencias en sus secuencias y repertorios. Se analizaron las propiedades fisicoquímicas de las secuencias CDR3; tamaño tanto del CDR3 completo como de la región N(D)N), y propiedades bioquímicas de los aminoácidos que lo conforman, así como en el análisis del repertorio mediante el estudio del nivel de convergencia y la diversidad. Los datos obtenidos de las subpoblaciones CD4+ y CD8+ de T-TIL expandidos también fueron comparados con los obtenidos en el repertorio de T-TIL iniciales. Los análisis se realizaron mediante el *framework* de uso libre VDJTools²⁸¹, usando las funciones previamente descritas (ver Material y Métodos, pág. 64).

2.2.1. Los T-TIL CD4+ y CD8+ presentan diferencias en las secuencias CDR3 TRB

El número de secuencias CDR3 nucleotídicas totales obtenidas fue, en las secuencias TRA, de 23398, 8811 y 5460 y, en las secuencias TRB, de 27413, 9245 y 5568 en las muestras iniciales y en los T-TIL purificados CD4+ y CD8+, respectivamente (Figura 18). La secuenciación se realizó de forma paralela y no mediante técnicas que permitan conocer el emparejamiento de las secuencias TRA y TRB.

Respecto al tamaño de la región CDR3nt completa, en las secuencias TRA la media del tamaño fue de 42 nt, 41 nt y 40 nt, en los grupos iniciales, CD4+ y CD8+, respectivamente. Sólo se observó una diferencia significativa entre los cultivos iniciales respecto a las muestras de LT CD8+ (Figura 19A, Tabla 7). En las secuencias TRB, la media del tamaño del CDR3 fue de 44 nt, 43 nt y 43 nt, en los grupos iniciales, CD4+ y CD8+, respectivamente (Figura 19B). Aunque estas diferencias entre grupos no resultaron significativas (Tabla 7), sí se observó una alta dispersión en los grupos CD4+ y CD8+, con valores mínimos (secuencias más cortas, de hasta 35 nt) en las muestras de LT CD8+.

La contribución en el tamaño por parte de las regiones V y J – contenidas, en parte, en las secuencias CDR3nt⁵ – tiene una variabilidad limitada, puesto a que son genes codificados en la línea germinal. Por el contrario, las regiones centrales N(D)N pueden presentar mayores diferencias en su tamaño, debido a que se forman mediante la adición y delección *random* de nucleótidos entre las regiones V(D)J. Por este motivo, se quiso comprobar si la variabilidad en el tamaño del CDR3nt, especialmente en las muestras CD8+, podía deberse a una diferencia en la región N(D)Nnt.

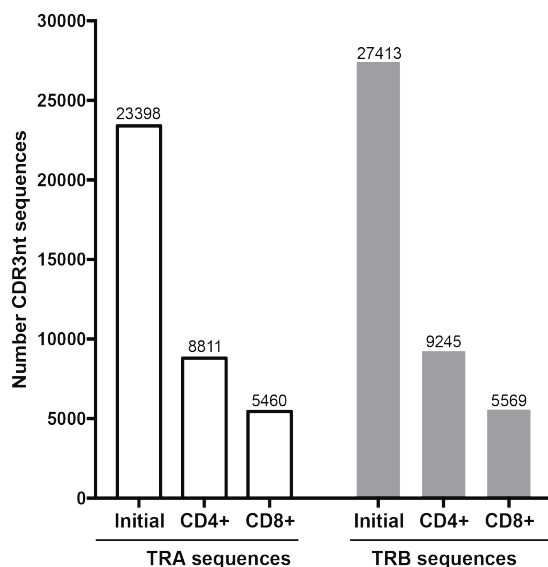


Figura 18. Número de secuencias CDR3nt totales obtenidas en los tres grupos de muestras; iniciales, CD4+ y CD8+, en la secuenciación de los transcritos TRA y TRB.

Respecto al tamaño de la región N(D)Nnt de las secuencias TRA, no se observó una diferencia significativa entre ninguno de los grupos, con unas medias de 4.76 nt, 5.46 nt y 4.6 nt, en los grupos iniciales, CD4+ y CD8+, respectivamente (Figura 20A, Tabla 7). Por el contrario, se observó que las regiones N(D)Nnt de las secuencias TRB en las muestras CD8+ eran significativamente más cortas, con una media de 11.4 nt, comparado con las de las muestras CD4+, de media 14.4 nt ($p = 0.004$), así como con las de las iniciales, de media 13.8 nt ($p = 0.019$) (Figura 20B, Tabla 7). Pese a que anteriormente se había encontrado que una correlación entre secuencias NDNnt más cortas a mayor porcentaje de LT CD4+ en los cultivos iniciales, en la comparación de LT expandidos y purificados, se encontraron regiones NDNnt de las secuencias TRB más largas en esta subpoblación.

⁵ La región CDR3nt contiene el final de una secuencia V y el principio de una secuencia J. Ver la sección “Estructura y generación del TCR” de la Introducción (página 6).

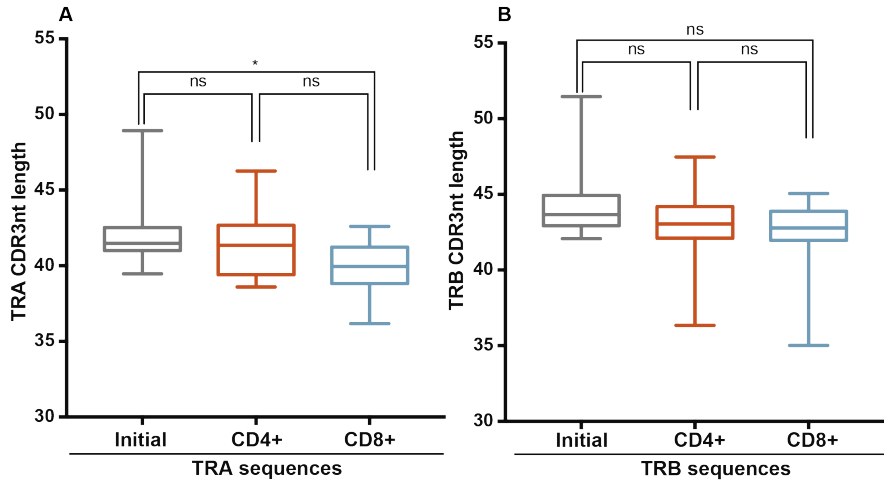


Figura 19. Tamaño del CDR3nt en los grupos de muestras iniciales, CD4+ y CD8+. (A) La media del tamaño de las secuencias TRA fue de 42 nt, 41 nt y 40 nt en los grupos iniciales, CD4+ y CD8+, respectivamente. No se observó una diferencia significativa entre el grupo de muestras inicial y CD4+, ni entre el grupo CD4+ respecto al CD8+, mientras que la diferencia sí fue significativa entre el grupo inicial y CD8+ ($p = 0.01$). (B) En las secuencias TRB, la media del tamaño de cada grupo fue de 44 nt, 43 nt y 43 nt en los grupos de muestras iniciales, CD4+ y CD8+, respectivamente. En este grupo de secuencias, no se observó ninguna diferencia significativa. Los valores de media se muestran en la Tabla 7 los valores individuales en Anexos, Tabla suplementaria 4).

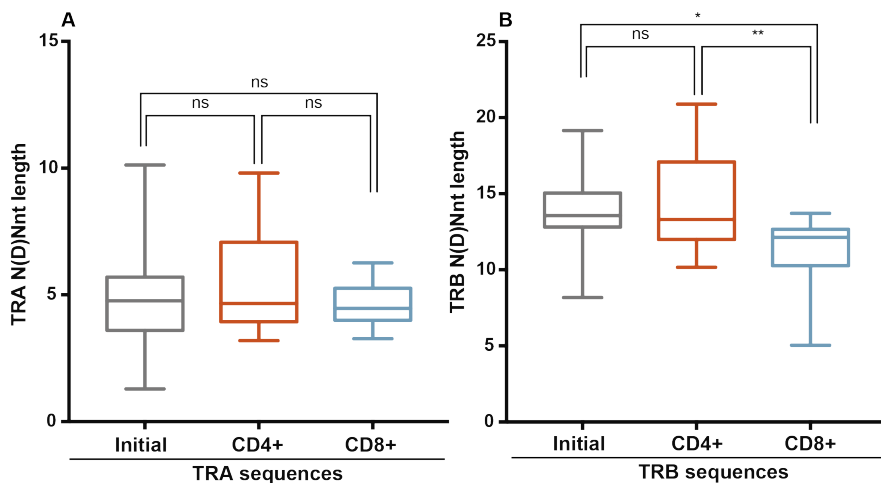


Figura 20. Tamaño de la región N(D)Nnt del CDR3 en los grupos de muestras iniciales, CD4+ y CD8+. (A) La media del tamaño de la región N(D)Nnt de las secuencias TRA fue de 4.76 nt, 5.46 nt y 4.6 nt en los grupos iniciales, CD4+ y CD8+, respectivamente, sin una diferencia significativa, ni entre los grupos iniciales y los CD4+ o CD8+, ni entre los CD4+ y CD8+. (B) La media del tamaño de las regiones N(D)Nnt en el caso de las secuencias TRB fue de 13.8 nt, 14.4 nt y 11.4 nt en los grupos iniciales, CD4+ y CD8+, respectivamente. Se observaron regiones N(D)Nnt del grupo de muestras CD8+ significativamente más cortas que las de las muestras iniciales ($p = 0.019$) y que las de las CD4+ ($p = 0.004$). Los valores de media se muestran en la Tabla 7 los valores individuales en Anexos, Tabla suplementaria 4.

Capítulo II. Resultados

Posteriormente, se hizo un estudio de las propiedades bioquímicas – índice de hidropatía, polaridad y carga – de los 5 aminoácidos centrales del CDR3aa de las secuencias TRA y TRB. De las tres propiedades analizadas, solamente se observaron diferencias en la carga de las secuencias TRB. Tampoco se observaron diferencias destacables entre los valores obtenidos en las secuencias TRA y TRB.

Los valores promedio obtenidos en los niveles de hidropatía de las secuencias TRA (Figura 21A) fueron de -1.04, -1.18 y -1.21, en los grupos de muestras iniciales, CD4+ y CD8+, respectivamente. En las secuencias TRB (Figura 21B) el nivel de hidropatía fue, de media, de -0.73, -0.95 y -0.97, en los grupos de muestras iniciales, CD4+ y CD8+, respectivamente. Pese que en ambos casos se detectaron secuencias con abundancia de aminoácidos hidrofílicos (valores negativos), el contenido de estos fue ligeramente superior en las TRA comparado con las TRB. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en ningún caso ni entre grupos de LT (Tabla 7).

En cuanto a los valores de carga en las secuencias TRA se obtuvo una media de 0.006, 0.026 y 0.003 en los grupos de muestras iniciales, CD4+ y CD8+, respectivamente, sin diferencias significativas (Figura 21C, Tabla 7). Por el contrario, en las secuencias TRB las muestras CD4+ presentaron, en conjunto, un valor de carga de 0.056, significativamente superior al obtenido en las muestras CD8+, con un valor de -0.036 ($p = 0.005$), y al de los cultivos iniciales, con un valor de -0.007 ($p = 0.045$) (Figura 21D, Tabla 7). Estos datos muestran una mayor presencia de aminoácidos cargados positivamente en los 5 aminoácidos centrales del CDR3 en las secuencias TRB de los LT CD4+ expandidos.

En el análisis de la polaridad de las secuencias TRA se obtuvieron, de media, valores de 0.57, 0.62 y 0.57, en los grupos de muestras iniciales, CD4+ y CD8+, respectivamente, sin diferencias significativas (Figura 21E, Tabla 7). En las secuencias TRB, estos valores fueron de 0.52, 0.56 y 0.59, en los grupos iniciales, CD4+ y CD8+, respectivamente, de nuevo sin diferencias significativas (Figura 21F, Tabla 7).

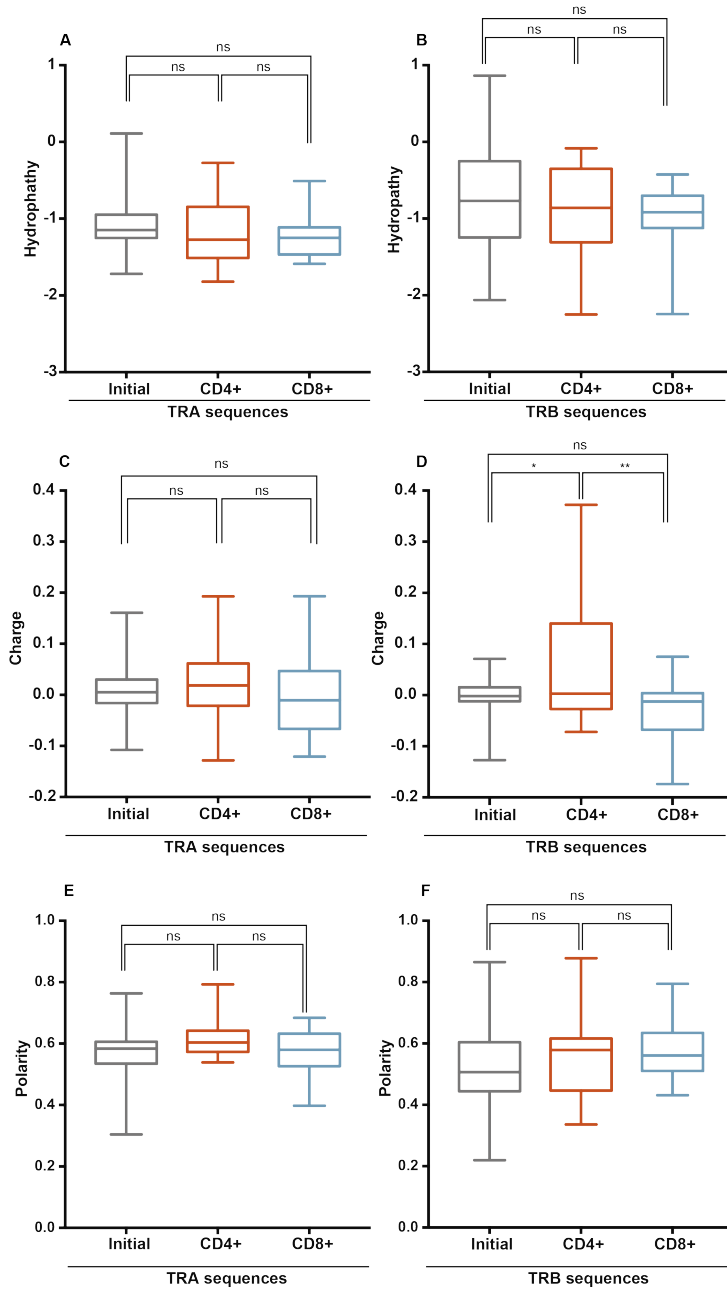


Figura 21. Propiedades bioquímicas aminoacídicas del CDR3 en los grupos iniciales, CD4+ y CD8+. No se encontraron diferencias significativas en el índice de hidropatía obtenido en las secuencias TRA (A) y en las secuencias TRB (B), así como tampoco en la polaridad de las secuencias TRA (E) y TRB (F). Los valores de carga obtenidos en las secuencias TRA (C) no mostraron diferencias significativas, pero sí se encontró en la carga de las secuencias TRB (D) de las muestras CD4+ ($\bar{x} = 0.06$) respecto a los grupos iniciales ($\bar{x} = -0.007$, $p = 0.045$) y CD8+ ($\bar{x} = -0.04$, $p = 0.005$). Los valores de media se muestran en la Tabla 7 los valores individuales en Anexos, Tabla suplementaria 4.

Tabla 7. Resumen de resultados de los análisis de características del TCR en los grupos iniciales, CD4+ y CD8+.

Análisis	Secuencias	Valores promedio			Valores p ajustados ^a			Figura
		Muestras iniciales	Muestras CD4+	Muestras CD8+	Inicial vs. CD4+	Iniciales vs. CD8+	CD4+ vs. CD8+	
Tamaño CDR3nt	TRA	42.09 nt	41.37 nt	39.91 nt	0.54	0.0103 (*)	0.14	Figura 19A
	TRB	44.12 nt	42.9 nt	42.54 nt	0.22	0.10	0.89	Figura 19B
Tamaño N(D)Nnt	TRA	4.76 nt	5.46 nt	4.6 nt	0.41	0.96	0.35	Figura 20A
	TRB	13.77 nt	14.42 nt	11.42 nt	0.71	0.019 (*)	0.004 (**)	Figura 20B
Índice de hidropatía	TRA	-1.18	0.14	0.16	0.54	0.50	0.99	Figura 21A
	TRB	-0.73	-0.95	-0.97	0.52	0.51	0.99	Figura 21B
Carga	TRA	0.006	0.03	0.003	0.69	0.99	0.69	Figura 21C
	TRB	-0.007	0.06	-0.04	0.045 (*)	0.52	0.005 (**)	Figura 21D
Polaridad	TRA	0.57	0.62	0.57	0.12	0.98	0.26	Figura 21E
	TRB	0.52	0.56	0.59	0.63	0.29	0.81	Figura 21F

^aValores p ajustados obtenidos del análisis estadístico, método de Tukey de comparación múltiple en ANOVA ordinario. Los valores significativos se muestran en negrita. * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001, **** p ≤ 0.0001.

En resumen, entre los subtipos de T-TIL CD4+ y CD8+ expandidos, se encontraron dos diferencias en las propiedades fisicoquímicas de sus secuencias CDR3: (i) secuencias TRB con regiones NDNnt de mayor tamaño en los LT CD4+ comparado con los CD8+; y (ii) una diferencia significativa en los 5 aminoácidos centrales de las secuencias TRB CDR3, en concreto, un mayor porcentaje de aminoácidos cargados negativamente en las secuencias de los LT CD8+.

A diferencia de los LT periféricos, los linfocitos infiltrantes han sido previamente activados en los linfonodos proximales y han migrado hacia el sitio del tumor. Por ello, podría ser que las diferencias encontradas entre subtipos de LT pudieran deberse, o bien a la propia etiología celular, o bien a la selección diferencial de ciertos clones en los distintos grupos. Con el fin de comprobar a qué se debían dichas diferencias, se estudiaron las mismas características de las secuencias TRB (ya que en las secuencias TRA no se encontraron diferencias significativas) en LT de sangre periférica de donantes sanos. Por otro lado, debido a que los T-TIL habían sido previamente expandidos *in vitro* en el laboratorio, se usaron las muestras de los donantes sanos para comparar que las diferencias encontradas de los LT no fueran causa de la expansión *in vitro*.

Las secuencias CDR3 de los LT CD4+ y CD8+ periféricos de donantes sanos no mostraron diferencias significativas en el tamaño de la región NDNnt (Figura 22A). Por otro lado, sí se observó una diferencia significativa en la carga de las secuencias TRB, con secuencias con un valor de carga de alrededor de 0 en las muestras de LT CD4+ y de -0.03 en LT CD8+ (Figura 22). Esta diferencia se observó tanto antes como después de las expansiones *in vitro*, con un incremento de la significancia en el segundo caso ($p = 0.012$ vs. $p = 0.008$). A pesar de que esto sugeriría que las expansiones podrían estar modificando el repertorio, en ninguna de las propiedades de las secuencias analizadas se observaron diferencias significativas tras la expansión (Figura suplementaria 6).

Cabe destacar que la dispersión de los valores de carga de las secuencias TRB en los T-TIL fue mucho mayor (entre -0.2 y 0.4) que en los LT periféricos (entre -0.06 y 0.02), sin embargo, se compararon los valores de todas las propiedades estudiadas entre LT periféricos expandidos y T-TIL expandidos, y no se observaron diferencias significativas (Figura suplementaria 7), indicando que, en conjunto, no pueden diferenciarse LT periféricos de donantes sanos con T-TIL, en base a estas características. Por último, se confirmó que en LT periféricos tampoco existían diferencias en el resto de las propiedades anteriormente analizadas (tamaño del CDR3nt, hidropatía y polaridad) (Figura suplementaria 8).

En resumen, la diferencia en la región NDNnt de las secuencias TRB encontrada entre T-TIL CD4+ y CD8+ no se observó en LT periféricos de donantes sanos, demostrando que no es una característica atribuible al subtipo celular. Se debería estudiar en mayor profundidad para confirmar si esta diferencia está asociada a la selección de ciertos clones en uno u otro subtipo, o diferencialmente en ambos. Por el contrario, la diferencia en la carga de las secuencias TRB parecería ser intrínseca al subtipo celular, mostrando un mayor uso de aminoácidos cargados negativamente en las secuencias de LT CD8+. Además, esta diferencia se vio incrementada por las expansiones *in vitro* y fue mucho más notable en los T-TIL, sugiriendo cierta relación con la activación y/o selección de los LT, a pesar de que también debería estudiarse más detalladamente.

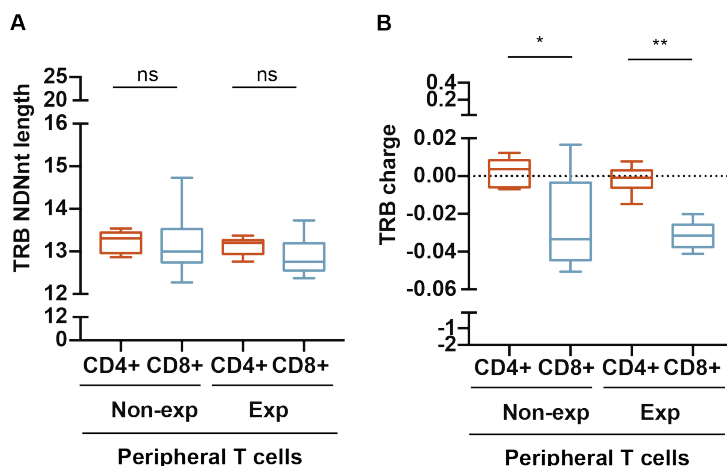


Figura 22. Diferencias en las secuencias TRB entre LT CD4+ y CD8+ periféricos de donantes sanos, antes y después de la expansión *in vitro*. (A) No se observaron diferencias significativas en el tamaño de la región NDNnt en ningún caso. (B) Los LT CD8+ mostraron secuencias con un mayor uso de aminoácidos con carga negativa, diferenciándose de forma significativa de los LT CD4+, tanto antes como después de la expansión *in vitro* e incrementada en este último caso ($p = 0.012$ y $p=0.008$, respectivamente).

2.2.2. Análisis de la diversidad del repertorio de TCR de los T-TIL CD4+ y CD8+

Tras las diferencias encontradas en las propiedades de las secuencias CDR3 entre los T-TIL CD4+ y CD8+, se analizaron las dos propiedades del repertorio de TCR previamente estudiadas en T-TIL iniciales (página 83); el nivel CR y la diversidad. Puesto a que la secuenciación del CDR3 se hizo en paralelo para las secuencias TRA y TRB, previamente se volvió a realizar una comparación de los valores de diversidad obtenidos en los dos grupos de secuencias, como control interno. Los valores de las muestras CD4+ y CD8+ también se compararon con los de las muestras de los cultivos iniciales, para determinar si, en conjunto, se producían cambios debido a las expansiones *in vitro*. La diversidad se evaluó, igual que en el análisis de los cultivos iniciales, usando el índice de Shannon-Wiener normalizado (nS-W).

De nuevo, se analizaron tanto los valores del nivel CR obtenidos de cada sección de forma separada como conjuntamente en una misma biopsia (Tabla 8). En las secuencias TRA, se observaron niveles de convergencia muy parecidos, tanto por sección como por biopsia y en los tres grupos de muestras (entre 1.04 y 1.1), sin diferencias significativas entre grupos (Figura 23A). En las secuencias TRB, el nivel de CR en el análisis por sección, también mostro valores similares en los tres grupos (entre 1.04 y 1.1) (Figura 23B). Sin embargo, en el análisis por biopsia, la convergencia

se vio incrementada en todos los grupos (entre 1.08 – 1.23) (Figura 23B). No se observó una diferencia significativa entre los grupos de muestras CD4+ y CD8+, pero sí entre iniciales y CD4+ ($p = 0.006$) e iniciales y CD8+ ($p < 0.0001$), sugiriendo que la expansión *in vitro* podría estar afectando al nivel de convergencia, seleccionando ciertos clones en varias secciones de una misma biopsia. Cabe destacar que se observó una gran dispersión tanto en el grupo de muestras CD4+ como en el de CD8+ en el análisis por biopsia.

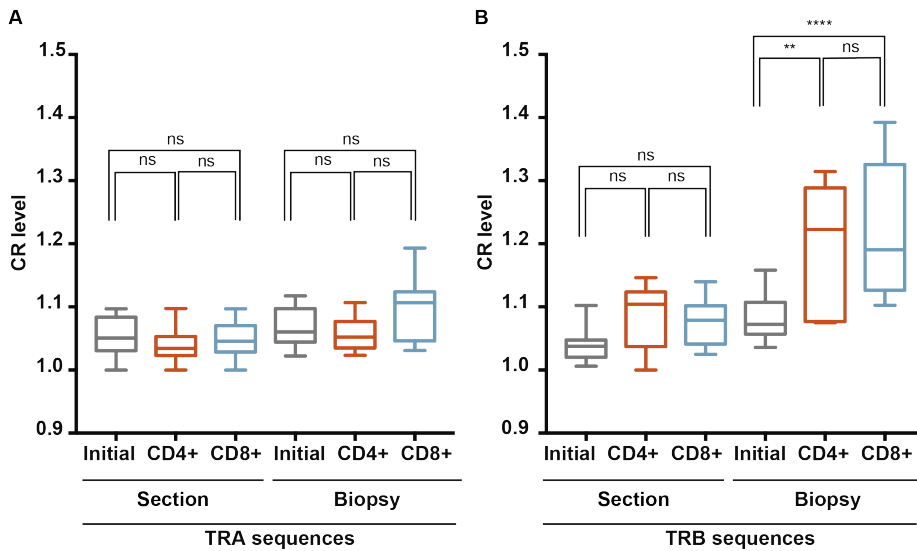


Figura 23. Nivel de convergencia (CR) en los grupos de muestras iniciales, CD4+ y CD8+, por sección y por biopsia. (A) En las secuencias TRA las medias de los niveles CR obtenidos fueron muy similares en todos los grupos (entre 1.04 y 1.1) sin diferencias significativas entre ellos. (B) En el grupo de secuencias TRB, las medias de los niveles CR obtenidos por sección se encontraban en rango similares y no se observaron diferencias significativas. Los valores obtenidos por sección fueron, de media, superiores en todos los grupos y se observó una alta dispersión en los grupos CD4+ y CD8+. Se encontró una diferencia significativa entre el grupo inicial y CD4+ ($p = 0.006$) CD8+ ($p < 0.0001$). Los valores de media se muestran en la Tabla 8 los valores individuales en Anexos, Tabla suplementaria 4.

Previamente al análisis comparativo de la diversidad entre T-TIL CD4+ y CD8+, se evaluó la correlación de la diversidad obtenida con las secuencias TRA y TRB y se observó una correlación significativa en todas las muestras (Figura suplementaria 5, Tabla 8) (CD4+, $R^2 = 0.9146$, $p < 0.0001$; CD8+, $R^2 = 0.9457$, $p < 0.0001$). Este resultado corroboró que se obtienen índices de diversidad parecidos usando las secuencias TRA o TRB en una misma muestra, pese a que las librerías fueran creadas en paralelo, tal y como se había comprobado en las muestras de T-TIL iniciales (página 83).

Las medias obtenidas de los índices de diversidad fueron de 0.48, 0.39 y 0.51 (Figura 24A) en las secuencias TRA y de 0.55, 0.38 y 0.51 (Figura 24B) en las secuencias TRB, en los grupos iniciales CD4+ y CD8+, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre grupos, ni en las secuencias TRA ni en las TRB, que a su vez mostraron niveles de diversidad similares (Figura 24, Tabla 8). El hecho de que no se encontraran diferencias en el índice de diversidad comparando las muestras iniciales con las muestras CD4+ y CD8+ indicaría que las expansiones *in vitro* no ocasionaron un decrecimiento significativo en la diversidad de las células T.

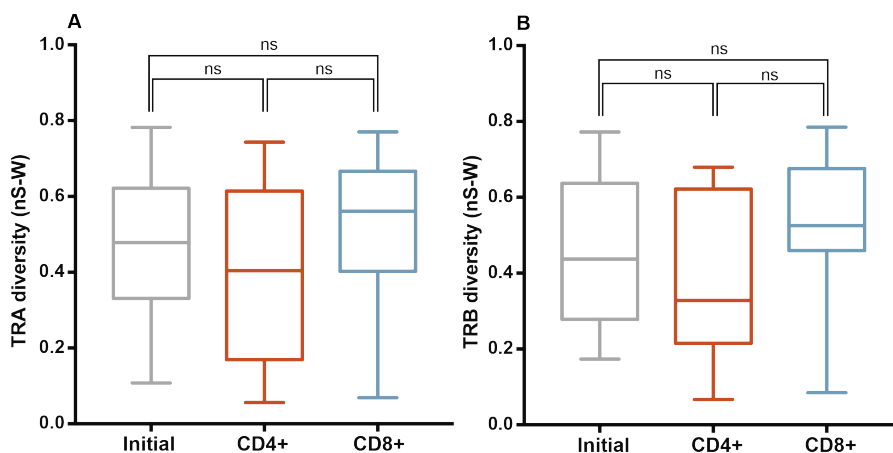


Figura 24. Diversidad del CDR3 en los grupos de muestras iniciales, CD4+ y CD8+. (A) La media de los índices de diversidad de nS-W obtenidos en las secuencias TRA fue de 0.48, 0.39 y 0.52 en los grupos de muestras iniciales, CD4+ y CD8+, respectivamente, (B) En las secuencias TRB, la media de los índices de diversidad fue de 0.45, 0.38 y 0.51, en los grupos iniciales, CD4+ y CD8+ respectivamente. No se observaron diferencias significativas en ningún grupo de muestras. Los valores de media se muestran en la Tabla 8 los valores individuales en Anexos, **Tabla suplementaria 4**

Dado que se observaron niveles de diversidad muy distintos, y especialmente dispersos en el grupo de muestras CD8+, esta variabilidad podría ser la causa de la falta de significancia. Por ello, seguidamente se hizo un análisis emparejado usando las muestras provenientes de una misma región de la biopsia de las que se disponían las secuencias tanto de CD4+ como de CD8+. Usando la prueba *t* apareada, se observó que las muestras CD8+ mostraban una diversidad en el repertorio de TCR significativamente mayor que las muestras CD4+, tanto en las secuencias TRA como en las TRB ($p = 0.04$ y $p = 0.02$, respectivamente) (

Figura 25A y

Figura 25B). Por lo tanto, pese a que a nivel global no se observó una diferencia significativa de la diversidad entre grupos, los T-TIL expandidos CD8+ sí mostraron una mayor diversidad que los CD4+ en la comparación de muestras de forma individual.

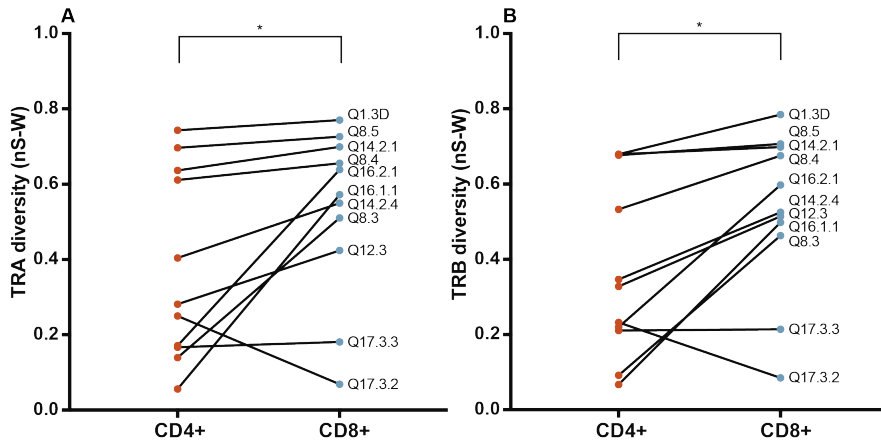


Figura 25. Diversidad del CDR3 en las muestras CD4+ y CD8+ emparejadas. Mediante la prueba *t* emparejada, usando las muestras de las que se habían podido expandir y secuenciar tanto CD4+ como CD8+, se observó una diferencia significativa tanto en las secuencias TRA (A) ($p = 0.044$) como en las secuencias TRB (B) ($p = 0.018$), siendo las muestras CD8+ aquellas con valores superiores de diversidad en todas las muestras excepto una (Q17.3.2). Los valores de media se muestran en la Tabla 8 los valores individuales en Anexos, Tabla suplementaria 4.

Tabla 8. Resumen de resultados de los análisis del nivel CR y de la diversidad del repertorio de TCR en los grupos iniciales, CD4+ y CD8+.

		Valores promedio			Valores p ^a					
Análisis	Secuencias	Muestras iniciales	Muestras CD4+	Muestras CD8+	Análisis estadístico	Inicial vs. CD4+	Iniciales vs. CD8+	CD4+ vs. CD8+	Figura	
Nivel CR	Por sección	TRA	1.05	1.04	1.05	Comparación múltiple de Tukey	0.85	0.1	0.82	Figura 23A
	Por biopsia		1.07	1.06	1.1		0.1	0.42	0.22	
	Por sección	TRB	1.04	1.08	1.07		0.14	0.5	0.38	Figura 23B
	Por biopsia		1.08	1.18	1.23		0.006 (**)	<0.0001 (****)	0.54	
Diversidad (índice de Shannon-Wiener normalizado)	TRA		0.48	0.39	0.52	Comparación múltiple de Tukey	0.42	0.82	0.21	Figura 24A
						Prueba <i>t</i> emparejada	-	-	0.044 (*)	Figura 25A
	TRB		Comparación múltiple de Tukey	0.52	0.74	0.21	Figura 24B			
			Prueba <i>t</i> emparejada	-	-	0.018 (*)	Figura 25B			

		Valores r ²			Valores p ^a			
Análisis	Secuencias	Muestras iniciales	Muestras CD4+	Muestras CD8+	Muestras iniciales	Muestras CD4+	Muestras CD8+	Figura
Regresión lineal	TRA vs. TRB	0.78	0.91	0.95	<0.0001	<0.0001	<0.0001	Figura suplementaria 5

^aValores p obtenidos de los distintos análisis estadísticos. Los valores significativos se muestran en negrita. * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001, **** p ≤ 0.0001.

Tal y como se había realizado anteriormente, se comprobó si los resultados del nivel CR y de la diversidad obtenidos con muestras de T-TIL expandidos eran similares en muestras de LT periféricos obtenidos de donantes sanos. No se encontraron diferencias significativas ni el nivel CR ni en la diversidad, ni antes ni después de las expansiones (Figura 26). De nuevo, se miró en LT periféricos si las expansiones *in vitro* podrían haber sesgado los resultados y no se encontraron diferencias significativas (Figura suplementaria 9). Por último, tras comparar los resultados obtenidos entre LT y T-TIL expandidos, no se observó diferencia en el nivel CR, pero, de forma esperable, sí se observó una gran diferencia en la diversidad (Figura suplementaria 10), ya que la diversidad periférica del repertorio en donantes sanos debe ser mucho mayor que dentro de un infiltrado tumoral. Esta diferencia fue mayor entre LT CD4+ ($p < 0.0001$) comparado con la encontrada en LT CD8+ ($p = 0.0006$).

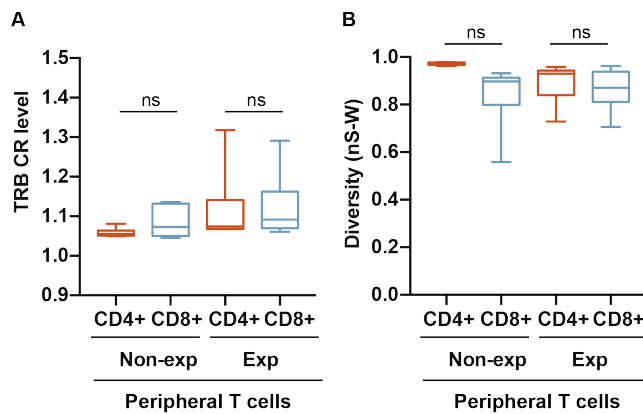


Figura 26. Diferencias en el repertorio de TCR entre los LT CD4+ y CD8+ periféricos de donantes sanos, antes y después de la expansión *in vitro*. No se encontraron diferencias significativas ni en el nivel CR (A) ni en la diversidad (B) entre las secuencias de LT CD4+ y CD8+, ni antes ni tras la expansión.

2.2.3. Análisis de las secuencias CDR3 públicas y el nivel de convergencia en los T-TIL CD4+ y CD8+

Una menor diversidad, o mayor clonalidad, podría ser el resultado de una selección de ciertos clones en el infiltrado. La menor diversidad observada en las muestras CD4+, comparado con la de las muestras CD8+, podría indicar una selección más restringida de clones en este primer grupo. Para estudiar si esta supuesta selección era parecida entre biopsias, se analizó la presencia de TCR públicos en los grupos CD4+ y CD8+. Se consideraron públicas las secuencias CDR3aa compartidas entre más de una biopsia.

En global, se observó un mayor porcentaje de secuencias públicas en las secuencias TRA comparado con las TRB (Figura 27), aunque, como era esperable, la mayoría de las secuencias eran exclusivas de cada biopsia, es decir secuencias privadas. En el caso

de las secuencias TRA, en el grupo de muestras CD4+, las secuencias públicas representaron un 2.5 %, mientras que en el de CD8+ el porcentaje fue de un 1.77 % (Figura 27A). En cuanto a las secuencias TRB, estos porcentajes fueron del 0.41 % y del 0.51 %, en los grupos de muestras CD4+ y CD8+, respectivamente (Figura 27B). Por lo tanto, no se observaron diferencias considerables entre las muestras CD4+ y CD8+ en cuanto al número de secuencias públicas.

El número total de secuencias TRA CDR3aa públicas fue de 103 y de 42 en los grupos CD4+ y CD8+, respectivamente. De las 103 del grupo de CD4+, tres se encontraron en tres biopsias, mientras que el resto eran compartidas entre dos biopsias (Figura 28A). En el grupo de muestras CD4+, la biopsia con un mayor número de secuencias compartidas fue la Q14, siendo a su vez la biopsia con un mayor tamaño, es decir, con un mayor número de secuencias de base (Figura 28A). De éstas, la mayoría se encontraron compartidas o bien con la Q1 (27 secuencias), o bien con la Q8 (21 secuencias) (Figura 28B), siendo éstas las dos biopsias con un mayor número de secuencias tras la Q14.

En el grupo de muestras CD8+, de las 42 secuencias compartidas, cuatro secuencias fueron encontradas en tres biopsias, mientras que el resto se encontraron en dos biopsias (Figura 28C). De forma similar al grupo CD4+, las biopsias con mayor solapamiento de secuencias fueron las de mayor tamaño, en este caso la Q16 y la Q1 (Figura 28C). El mayor número de secuencias compartidas se encontró entre las cuatro biopsias con un mayor tamaño – Q16, Q1, Q8 y Q14 – con un máximo de 9 secuencias compartidas entre la Q16 y la Q14 (Figura 28D).

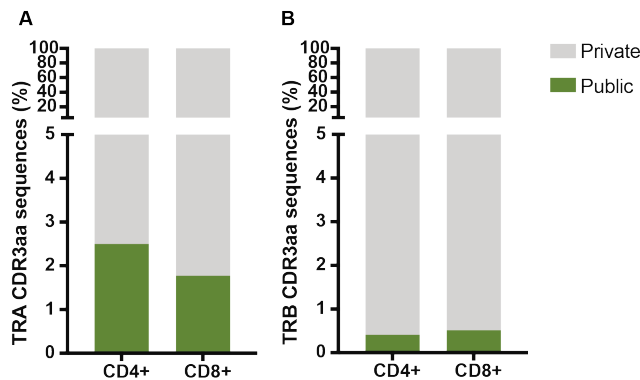


Figura 27. Porcentajes de secuencias públicas y privadas en los grupos de muestras CD4+ y CD8+. (A) El porcentaje de secuencias TRA públicas fue del 2.5 % y del 1.77 % en los grupos CD4+ y CD8+, respectivamente. (B) El porcentaje de secuencias TRB públicas obtenido fue del 0.41 % y del 0.51 % en los grupos CD4+ y CD8+, respectivamente. Los porcentajes de secuencias públicas fueron calculados dividiendo el número de secuencias CDR3aa públicas por el número total de secuencias CDR3aa en cada grupo de muestras.

Se encontraron 17 secuencias TRB públicas entre las muestras CD4+. Al contrario que lo observado en las secuencias TRA, las biopsias de mayor tamaño no fueron las que presentaron un mayor número de secuencias públicas. En este caso, las biopsias con más secuencias públicas fueron la Q16 y la Q1 (Figura 29B); la Q1 era la biopsia con mayor tamaño en segundo lugar, mientras que la Q16 era la tercera muestra con menor número de secuencias (Figura 29A).

En las muestras CD8+ se encontraron 12 secuencias TRB públicas. Entre éstas, sólo una de las secuencias del grupo de muestras CD8+ se encontró en tres biopsias, el resto de las secuencias compartidas estaban presentes en dos biopsias (Figura 29A, Figura 29C). En el caso de las CD8+, sí se encontró que la biopsia con un mayor número de secuencias TRB era aquella que más secuencias compartía con otras muestras: dos secuencias con la Q14 y dos secuencias con la Q17. Sin embargo, a su vez, las biopsias Q16 y Q14, así como la Q8 y la Q16 también compartían dos secuencias (Figura 29C, Figura 29D).

En resumen, se observó un mayor grado de solapamiento en las secuencias TRA respecto a las TRB y, en particular, en el grupo de secuencias procedente de los T-TIL CD4+ expandidos (103 secuencias TRA *vs.* 17 secuencias TRB públicas) comparado con las CD8+ (42 secuencias TRA *vs.* 12 secuencias TRB públicas). En ambas comparaciones se observó que, en general, las secuencias eran compartidas entre máximo tres biopsias, aunque la mayoría se encontraron en dos biopsias, y no se hallaron evidencias de que las biopsias con mayor solapamiento fueran del mismo tipo de tumor de mama.

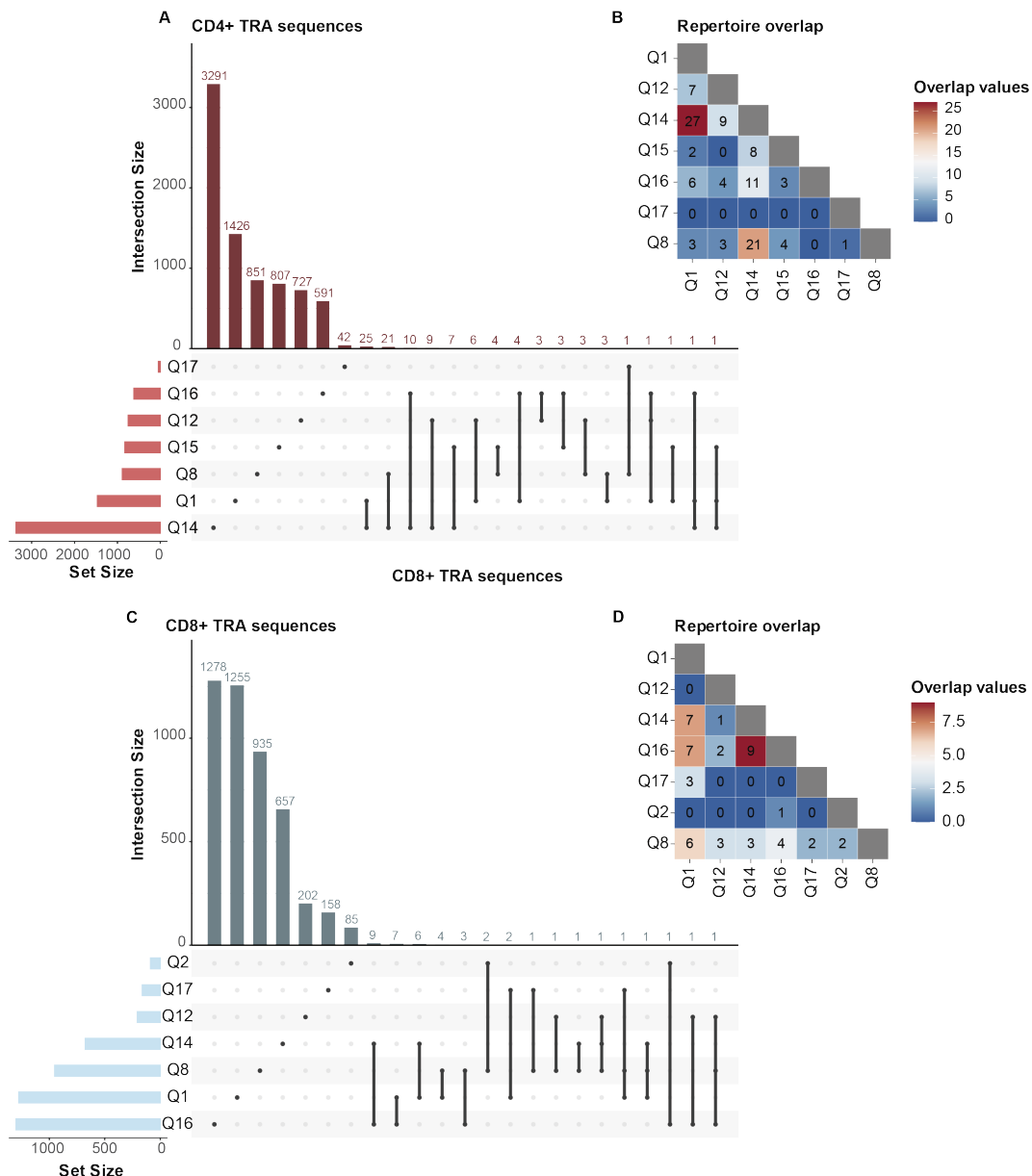


Figura 28. Coincidencia de secuencias TRA CDR3aa compartidas entre biopsias en los grupos CD4+ y CD8+. El número de secuencias CDR3aa obtenidas en cada biopsia en los grupos CD4+ (A) y CD8+ (C) representados con *UpsetPlots*, en los que también se muestra el número de secuencias compartidas, así como el tamaño de las muestras. El solapamiento de repertorio en los grupos CD4+ (B) i CD8+ (D) indica el número de secuencias compartidas entre las distintas biopsias. En total, se observaron 103 y 42 secuencias públicas en los grupos CD4+ y CD8+, respectivamente. Las biopsias Q14, Q1 y Q18 fueron las que presentaron un mayor número de secuencias compartidas en las muestras CD4+, mientras que en las muestras CD8+, estas fueron la Q1, la Q14, la Q16 y la Q8.

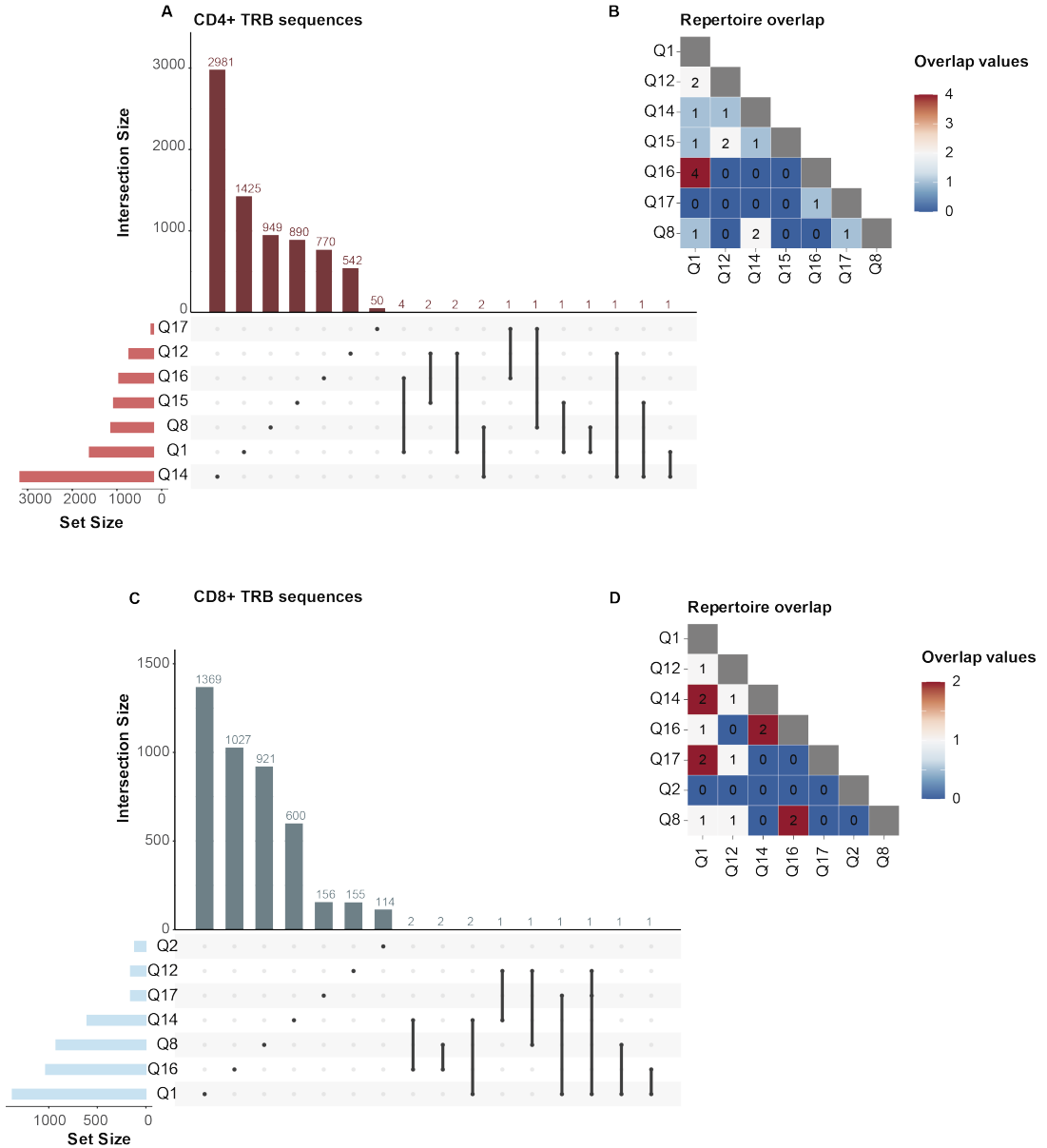


Figura 29. Coincidencia de secuencias TRB CDR3 compartidas entre biopsias en los grupos CD4+ y CD8+. Los *UpsetPlots* muestran el número de secuencias CDR3aa obtenidas en cada biopsia en los grupos CD4+ (A) y CD8+ (C), así como el número de secuencias compartidas y el tamaño de las muestras. El solapamiento de repertorio en los grupos CD4+ (B) i CD8+ (D) indica el número de secuencias compartidas entre las distintas biopsias. En total, se observaron 17 y 12 secuencias públicas en los grupos CD4+ y CD8+, respectivamente. En el grupo de muestras CD4+, las biopsias con un mayor número de secuencias compartidas fueron la Q1 y la Q16, mientras que en el de CD8+ fueron la Q1, la Q14 y la Q16.

Aunque no se observaran diferencias relevantes en el número de secuencias públicas en los grupos de muestras CD4+ y CD8+, éstas podrían encontrarse en proporciones muy distintas en cada muestra. Es decir, una biopsia podría tener solamente una secuencia pública, pero ser la secuencia mayoritaria, o, de forma inversa, una biopsia podría presentar muchas secuencias públicas pero que estas estuvieran en baja frecuencia. Por este motivo, se estudió la frecuencia normalizada – por el tamaño de la muestra – de cada una de las secuencias públicas encontradas en las distintas biopsias.

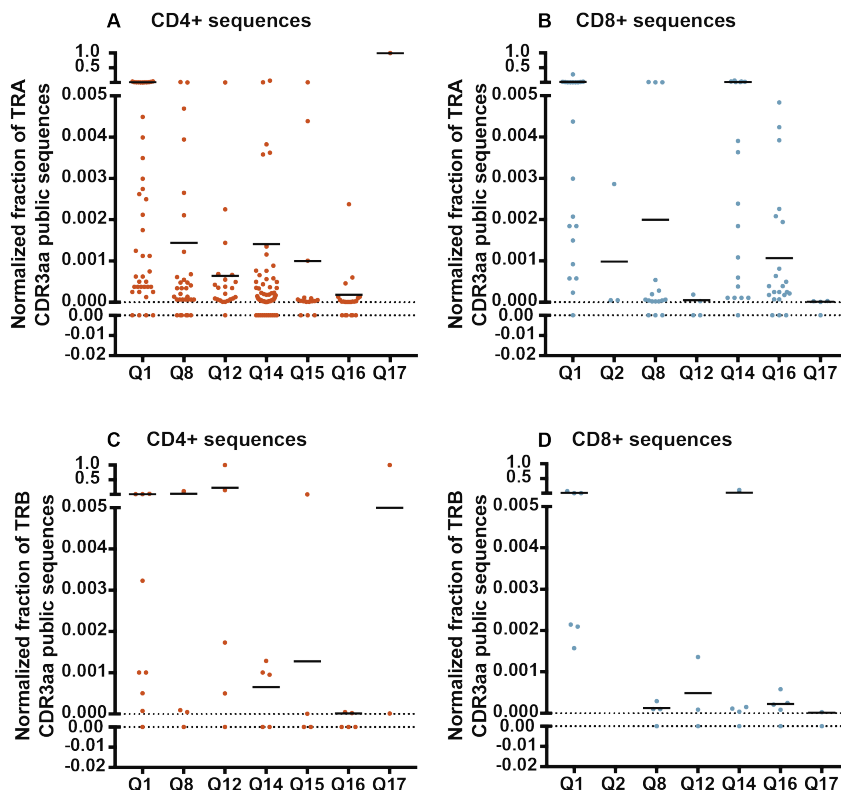


Figura 30. Frecuencia normalizada de las secuencias CDR3aa públicas presentes en las distintas biopsias en los grupos de muestras CD4+ y CD8+. Los puntos representan las secuencias públicas presentes en cada biopsia y la fracción normalizada en la que se encuentran. (A) La mayoría de las secuencias TRA públicas en el grupo de muestras CD4+ se encontraron en fracciones relativamente bajas (0.0001-0.005) en todas las biopsias excepto en la Q1 y la Q17. (B) Las secuencias TRA en el grupo de muestras CD8+ también se observaron en fracciones bajas (0.0001-0.005) excepto en la Q1 y la Q14. (C) El número de secuencias TRB públicas fue inferior, aunque éstas se observaron en frecuencias ligeramente superiores en el grupo de muestras CD4+ (superiores al 0.005 en casi todas las biopsias excepto en la Q14, Q15 y Q16). (D) En el grupo de muestras CD8+, el número de secuencias públicas también era menor, pero no se observó un cambio relevante en sus fracciones y las dos biopsias con unas medias mayores fueron la Q1 y la Q14.

Cabe remarcar que, a pesar de que se encontraron muchas más secuencias TRA que TRB públicas, la mayoría de ellas se encontraron en bajas frecuencias (menores a 0.005) y, por ello, la media de la frecuencia fue inferior en la mayoría de las biopsias, comparado con la de las secuencias TRB. Sin embargo, el número de secuencias en alta frecuencia (superiores a 0.005) no fue muy distinto en el grupo de secuencias TRA respecto al de las TRB (Figura 30A, Figura 30C).

En el análisis de secuencias TRA públicas, las que se encontraron en mayores porcentajes, en el grupo CD4+, procedían de las biopsias Q1 y Q17 (Figura 30A). Pese a que la Q14 fue la biopsia con un mayor número de secuencias públicas en este grupo, éstas no se encontraron en porcentajes muy altos. Asimismo, en la biopsia Q17 en este grupo, tan sólo se encontró una secuencia pública, pero ésta ocupaba una fracción mayoritaria en la muestra (0.8). Por el contrario, en el grupo de muestras CD8+, las dos biopsias con secuencias públicas encontradas en mayor porcentaje fueron la Q1 y la Q14 (Figura 30B), en este caso dos de las biopsias con mayor número de secuencias públicas.

Respecto a las secuencias TRB públicas, en el grupo de muestras CD4+, la mayoría de las biopsias mostraron una media de la frecuencia de las secuencias públicas elevadas, excepto la Q14, la Q15 y la Q16 (Figura 30C). En el grupo de muestras CD8+, sin embargo, no se observó una diferencia muy notable, es decir, las secuencias públicas representaban, en conjunto, un porcentaje similar en el análisis de las secuencias TRA y en el de las TRB (Figura 30B, 30D). Las dos biopsias con secuencias TRB públicas en mayores porcentajes fueron, al igual que en el caso de las TRA, las biopsias Q1 y Q14 (Figura 30D).

El análisis de secuencias públicas determinó que, aunque existía un mayor número de éstas en los T-TIL CD4+ que en los CD8+, solamente algunas de ellas se encontraron en fracciones elevadas. Asimismo, a pesar de las pocas secuencias TRB públicas, algunas de ellas también se hallaron en fracciones elevadas.

Un mayor número de secuencias públicas podría estar relacionado con una selección de ciertos TCR, a pesar de que éstos podrían estar originalmente codificados por secuencias nucleotídicas distintas. Por ello, y aunque anteriormente se había comprobado el nivel CR en los grupos CD4+ y CD8+ (Figura 23), se comprobó si había diferencias en el nivel CR al separar por públicas y privadas en los dos grupos de T-TIL. Para ello, se analizó qué porcentaje ocupaban las combinaciones de los distintos tipos de secuencia: secuencias CR, aquellas con más de una secuencia CDR3nt codificando para la misma secuencia CDR3aa; secuencias noCR, aquellas que se encontraron codificadas por una sola secuencia CDR3nt; secuencias públicas, compartidas por más de una biopsia y; secuencias privadas, únicas de un tipo de biopsia.

Capítulo II. Resultados

Tanto en las secuencias TRA (Figura 31A) como en las TRB (Figura 31B), el grupo mayoritario fueron las secuencias noCR privadas (con porcentajes de entre un 84 % y un 88 %). Sin embargo, mientras que en las secuencias privadas la mayoría de ellas eran secuencias noCR, en las secuencias públicas, se encontraron mayores porcentajes de secuencias CR, en ambos casos y tanto en los grupos CD4+ como CD8+.

Por otro lado, se agruparon las secuencias en los grupos de secuencias CR y noCR y se miró qué espacio ocupaban las secuencias públicas en cada uno de ellos. Se observaron porcentajes superiores de secuencias públicas entre las CR comparado con las noCR, aunque éstos fueron mayores en las secuencias TRA (18.64 % en las CD4+ y 11.78 % en las CD8+) (Figura 31C) comparado con las TRB (Figura 31D) (2.06 % en las CD4+ y 3.05 % en las CD8+). Los porcentajes de secuencias públicas entre las noCR fueron muy bajos en ambos casos y en todos los grupos (entre un 0.1 % y un 0.3 %).

En resumen, las secuencias públicas mostraron una mayor convergencia, es decir, un número mayor de secuencias nucleotídicas codificando una misma secuencia aminoacídica. La mayor parte de secuencias públicas se identificaron entre las secuencias CR, mientras que en las noCR la mayoría de ellas eran secuencias privadas. No obstante, no se observaron diferencias relevantes en cuanto al número de secuencias públicas y privadas en los grupos CR y noCR, entre las muestras CD4+ y CD8+.

Se realizaron agrupaciones por tipo de tumor (CMLA, CMLB y CMTN) y no se encontró ninguna diferencia en comparación a los resultados obtenidos con todas las biopsias agrupadas. Es decir, no se observó un mayor número de TCR públicos, así como tampoco diferencias en los niveles de CR entre biopsias del mismo subtipo de cáncer de mama.

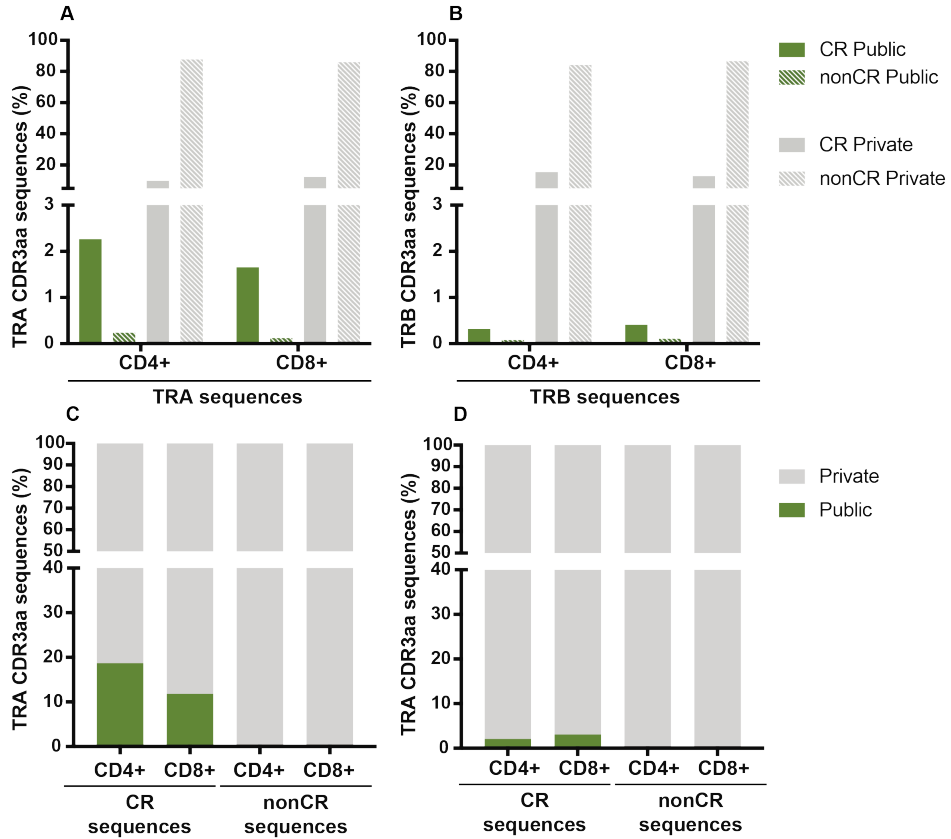


Figura 31. Porcentajes de secuencias CR y noCR, públicas y privadas, dentro de los grupos de muestras CD4+ y CD8+. (A) Porcentaje de los distintos tipos de secuencias TRA en los grupos CD4+ y CD8+. (B) Porcentaje de los distintos tipos de secuencias TRB en los grupos CD4+ y CD8+. (C) Porcentajes de secuencias TRA públicas y privadas dentro de las secuencias CR y las secuencias noCR, en los grupos CD4+ y CD8+. (D) Porcentajes de secuencias TRB públicas y privadas, dentro de las secuencias CR y las secuencias noCR, en los grupos CD4+ y CD8+. La mayoría de las secuencias en todos los grupos eran secuencias noCR privadas. La mayoría de las secuencias públicas eran secuencias CR. Los porcentajes de secuencias públicas dentro de los grupos CR fueron mayores que dentro de las secuencias noCR.

Parte 2

Los datos previamente obtenidos mostraron que, en los T-TIL iniciales, una menor diversidad está asociada a un mayor porcentaje de LT CD4+. El mismo resultado se confirmó en la comparación de T-TIL CD4+ y CD8+ expandidos. Sin embargo, la selección de ciertos clones de T-TIL CD4+, dando como resultado una baja diversidad, no parecía tener su origen en una mayor convergencia ni en una mayor expansión de secuencias públicas. Por ello, se podía suponer que las expansiones en cada paciente eran distintas e independientes al tipo de tumor de mama. No obstante, los clones supuestamente seleccionados y expandidos podrían no ser idénticos, pero mostrar un alto grado de similitud. La segunda parte de este estudio se centró en un análisis más profundo de estas secuencias, con el fin de determinar si una baja diversidad podría deberse a la selección de ciertos clones no idénticos pero similares entre pacientes.

2.2.4. Estudio de la similitud de secuencias CDR3 en los T-TIL CD4+ y CD8+

El análisis de similitud se realizó usando la herramienta bioinformática GLIPH2^{290,291} (ver página 66) con las secuencias TRB (ya que solo está disponible para el análisis de dichas secuencias), que identifica *clusters* basados en motivos; secuencias de mínimo tres aminoácidos iguales dentro de las secuencias CDR3aa. Solamente se consideraron aquellos *clusters* con *scores* <0.5 en los análisis estadísticos de Fisher y en el test de expansión para seleccionar motivos significativamente expandidos.

De forma general, en las muestras del grupo CD4+, se encontró un mayor número de motivos conformados por un mayor número de secuencias, mientras que en las muestras del grupo CD8+, este número fue menor (Figura 32). Mientras que en el grupo de muestras CD4+ se encontró un alto número de secuencias agrupadas en todas las biopsias estudiadas, excepto en dos (la Q1 y la Q17), en el grupo CD8+ se encontraron menos secuencias agrupadas en la mayoría de las biopsias, a excepción de la Q1 y la Q2, que presentaron un mayor número de secuencias.

En cuanto a los motivos compartidos entre biopsias, en las muestras CD4+ se encontraron 45 motivos, de los cuales 15 eran compartidos entre por lo menos dos biopsias (Figura 33A). Las dos biopsias con un mayor número de motivos fueron la Q14, Q15 y la Q12 (21 motivos las dos primeras y 15 la segunda). Las dos biopsias que compartían más motivos en este grupo fueron la Q15 y la Q12. Sin embargo, pese a que en la biopsia Q14 también se identificaron 21 motivos, sólo cinco de ellos se encontraron en otras biopsias. Varios de los motivos encontrados estaban formados por más de cinco secuencias y en ocasiones más de 10 secuencias agrupadas (Figura 33B).

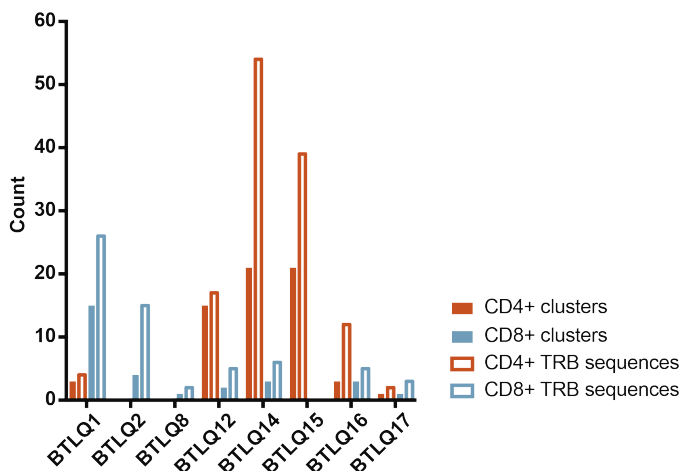


Figura 32. Número de motivos y de secuencias TRB CDR3aa que los conforman en cada biopsia en los grupos de muestras CD4+ y CD8+. Los agrupamientos se realizaron mediante la herramienta GLIPH2 y se seleccionaron aquellos con *scores* <0.5 en los análisis estadísticos de Fisher y en los test de expansión. En la biopsia Q8 no se encontraron motivos en el grupo de LT CD4+. En la biopsia Q2 se analizaron solamente LT CD8+ y en la biopsia Q15 solamente LT CD4+.

En las muestras CD8+, se identificaron 25 motivos, cuatro de ellos compartidos entre la biopsia Q1 con las biopsias Q8, Q12, Q14 y Q16, por separado (Figura 33C). La biopsia Q1 fue, además, la muestra con un mayor número de motivos intra-biopsia (15 motivos), seguida de la Q2, con cuatro motivos. Tanto en la Q1 como en la Q2 – las dos biopsias TN – se encontraron muchas más secuencias agrupadas en motivos que en el resto de las biopsias. El número máximo de secuencias formando un motivo fue de siete secuencias en tres motivos distintos (Figura 33D). A diferencia de los motivos encontrados en el grupo de muestras CD4+, en este grupo la mayoría de los motivos estaban formados por pocas secuencias (sin ningún motivo formado por 10 o más secuencias agrupadas).

Las biopsias con un mayor número de secuencias CDR3aa – la Q14 en el grupo de CD4+ y la Q1 en el grupo de CD8+ (Figura 29) – también fueron de las biopsias con un mayor número de motivos intra-biopsia. Sin embargo, también se observó un elevado número de motivos en otras biopsias como la Q15 en el grupo de CD4+ o la Q2 en el grupo de CD8+. Esto, parecía indicar que el número de secuencias totales en una muestra no estuviera directamente relacionado con el número final de motivos encontrados. Con el fin de corroborarlo, se calculó la correlación entre el número de *reads*, así como el número de secuencias, con el número de motivos totales y de motivos compartidos.

En el grupo CD4+, el número total de motivos encontrado se encontró una correlación positiva con el número total de *reads*, aunque no con el número de motivos compartidos (Figura 34A, Figura 34B). De hecho, las muestras con un mayor número

Capítulo II. Resultados

de *reads* en este grupo, no eran aquellas con un mayor número de motivos compartidos. Esto sugeriría que los motivos se encuentran, sobre todo, de forma individual en cada biopsia.

En cuanto a las secuencias de LT CD8+, en las que se encontró un número de secuencias y *reads* menor, el número de motivos totales no se correlacionó ni con el número de *reads* ni con el número de secuencias. Por el contrario, se encontró una correlación positiva entre el número de secuencias y el número de motivos compartidos (Figura 34C, Figura 34D). Esto debe considerarse con cautela, dado que en cualquier caso el número de motivos obtenido fue muy bajo en todas las biopsias en el estudio de células CD8+.

Aunque en general no se encontró relación entre los motivos y los distintos tipos de tumores de mama – luminales y TN – tal y como se observó con los TCR públicos, sí es destacable que las dos biopsias con un mayor número de motivos en el grupo de células CD8+ fueran TN.

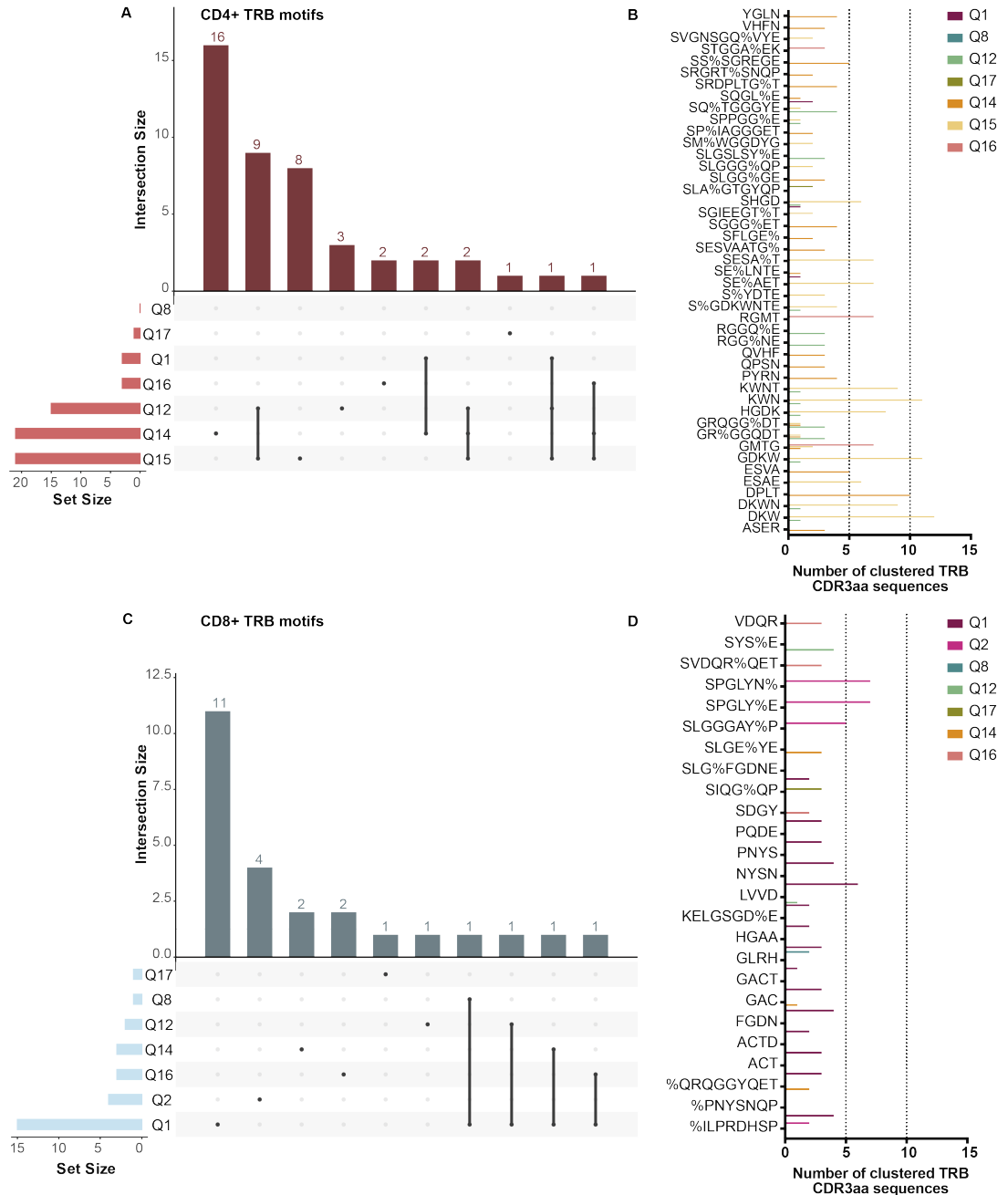


Figura 33. Motivos encontrados en las secuencias TRB CDR3aa, en los grupos de muestras CD4+ y CD8+. *UpsetPlot* de los motivos encontrados mediante GLIPH2⁹⁰ en cada biopsia en el grupo CD4+ (A) y CD8+ (C). Las líneas que unen los puntos muestran los motivos compartidos entre biopsias. El *set size* indica el número de motivos encontrados en cada biopsia. Se muestran las secuencias aminoacídicas de los 45 motivos con el número de secuencias CDR3 en cada *cluster* en el grupo de muestras CD4+ (B) y CD8+ (D).

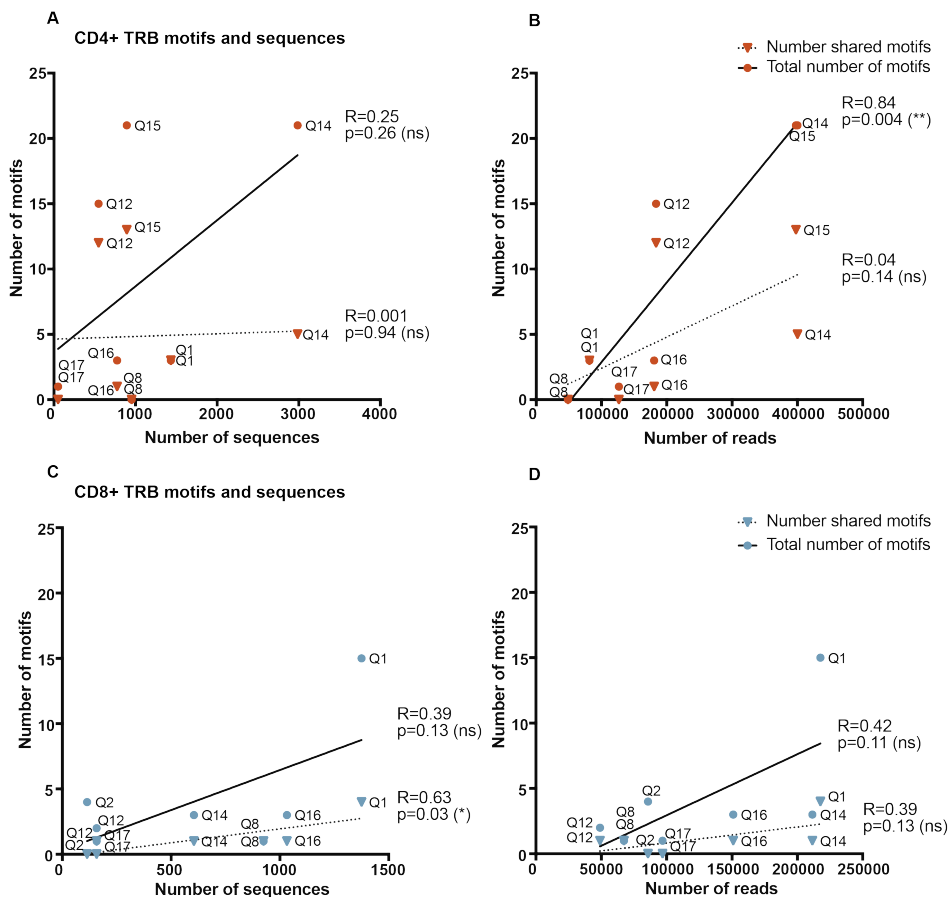


Figura 34. Correlaciones entre el número de secuencias y *reads* con el número de motivos totales y compartidos encontrados. Las líneas continuas muestran la regresión lineal con el número total de motivos y las líneas discontinuas con el número de motivos compartidos. (A) Correlación entre el número de secuencias TRA presentes en cada biopsia y el número de motivos, en el grupo de muestras CD4+, sin correlación significativa en ningún caso. (B) Correlación entre el número de *reads* de secuencias TRB en cada biopsia y el número de motivos, en el grupo de muestras CD4+. Se observó una correlación significativa ($p = 0.004$) entre el número de *reads* y el número de motivos totales obtenidos. (C) Correlación entre el número de secuencias TRA presentes en cada biopsia y el número de motivos, en el grupo CD8+. Se observó una correlación significativa entre el número de secuencias y el número de motivos compartidos ($p = 0.03$). (D) Correlación entre el número de *reads* de secuencias TRB y el número de motivos, en el grupo CD8+, sin correlación significativa en ningún caso.

2.2.5. Caracterización de motivos CDR3 TRB significativamente expandidos en los repertorios de T-TIL CD4+ y CD8+

Las secuencias agrupadas por motivos obtenidas del anterior análisis se caracterizaron y se compararon con el conjunto de secuencias totales. Esto serviría para determinar si dichas secuencias, pese a estar seleccionadas las significativamente expandidas, eran similares o representativas de los conjuntos de muestras CD4+ y CD8+.

En primer lugar, se miraron las fracciones normalizadas (entre -1 y 1) de las secuencias agrupadas en motivos en las muestras, es decir, qué porcentajes ocupaban en cada biopsia, normalizando por el tamaño de cada biopsia (Figura 35). Todas las biopsias mostraron una media de la frecuencia superior al 0.005, tanto en los grupos de muestras CD4+ como CD8+ (Figura 35). En el grupo de muestras CD4+, destacaron (con medias superiores al 0.1) las biopsias Q12 y la Q17 y se encontraron las secuencias mayoritarias de tres biopsias (Q12, Q15 y Q16). En el grupo de muestras CD8+, las biopsias Q2 y Q17 mostraron medias superiores al 0.1 y se encontró la secuencia mayoritaria de la biopsia Q17.

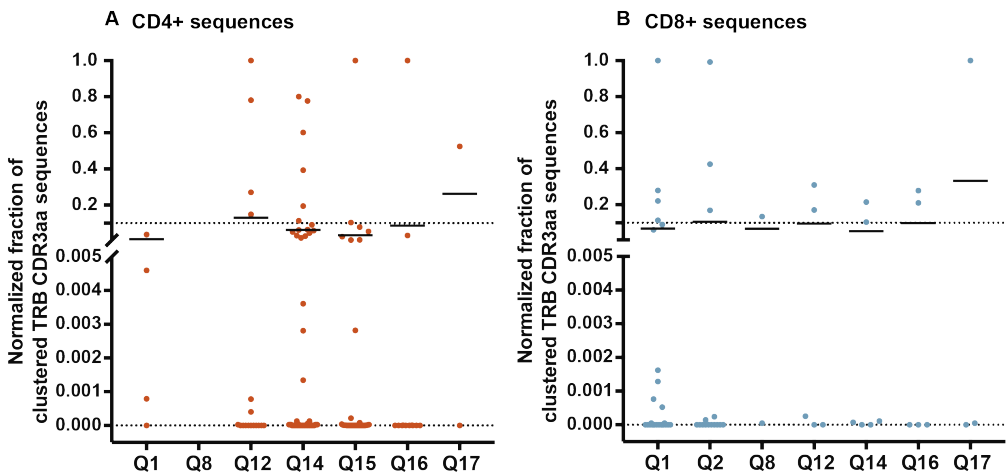


Figura 35. Frecuencia normalizada de las secuencias TRB CDR3aa agrupadas en el análisis de motivos presentes en las distintas biopsias en los grupos de muestras CD4+ y CD8+. Los puntos representan las secuencias públicas presentes en cada biopsia y la fracción normalizada en la que se encuentran. (A) Secuencias TRB agrupadas en el grupo de muestras CD4+ y (B) secuencias TRB agrupadas en el grupo de muestras CD8+. +. La media de las frecuencias en cada biopsia fue relativamente alta (superiores a un 0.005), destacando la Q12 y la Q17 en el grupo CD4+ y la Q2 y la Q17 en el grupo CD8+, con medias superiores a 0.1.

Seguidamente, se compararon los perfiles de estas secuencias con el total de secuencias agrupadas en los grupos CD4+ y CD8+, así como con las secuencias mayoritarias (con porcentajes superiores al 0.1 %). Concretamente, se miró el uso de

Capítulo II. Resultados

los segmentos V y J para ver si aquellos incrementados en frecuencia en los totales, también lo eran en los conjuntos de secuencias agrupadas por motivos.

En el grupo de muestras CD4+ (Figura 36), se observaron perfiles más similares entre los tres grupos de secuencias que en el grupo CD8+ (Figura 37). En parte, esto podría deberse a que el número de secuencias agrupadas en los motivos del grupo CD8+ fue mucho menor al obtenido en el CD4+. Los segmentos más frecuentes en el grupo CD4+ fueron el TRBV3.1 y el TRBV2 (Figura 36A), y el TRBJ1.1 y TRBJ1.2 (Figura 36B). En el grupo de muestras CD8+ en las secuencias agrupadas por motivos, se observó una mayor frecuencia de los segmentos TRBV19 (Figura 37A) y TRBJ1.5 (Figura 37B), mientras que en el resto de los grupos los segmentos más frecuentes fueron el TRBV9 y el TRBJ2.1.

De forma esperable, el grupo de secuencias superiores al 0.1 % presentó un perfil de segmentos V y J similar al total, puesto que los perfiles se calcularon teniendo en cuenta no sólo el número sino también la frecuencia en la que se encuentran las secuencias. Por lo tanto, las secuencias mayoritarias tienen mayor peso en los totales y en consecuencia afectan más al perfil global que las secuencias minoritarias.

Por último, se estudió el nivel CR de las secuencias agrupadas por motivo para ver si éstas presentaban niveles CR distintos a los globales. Aunque en las secuencias agrupadas se observó una gran dispersión entre biopsias, en conjunto no se observaron diferencias significativas comparado con los niveles CR globales, ni entre los grupos de muestras CD4+ y CD8+ (Figura 38).

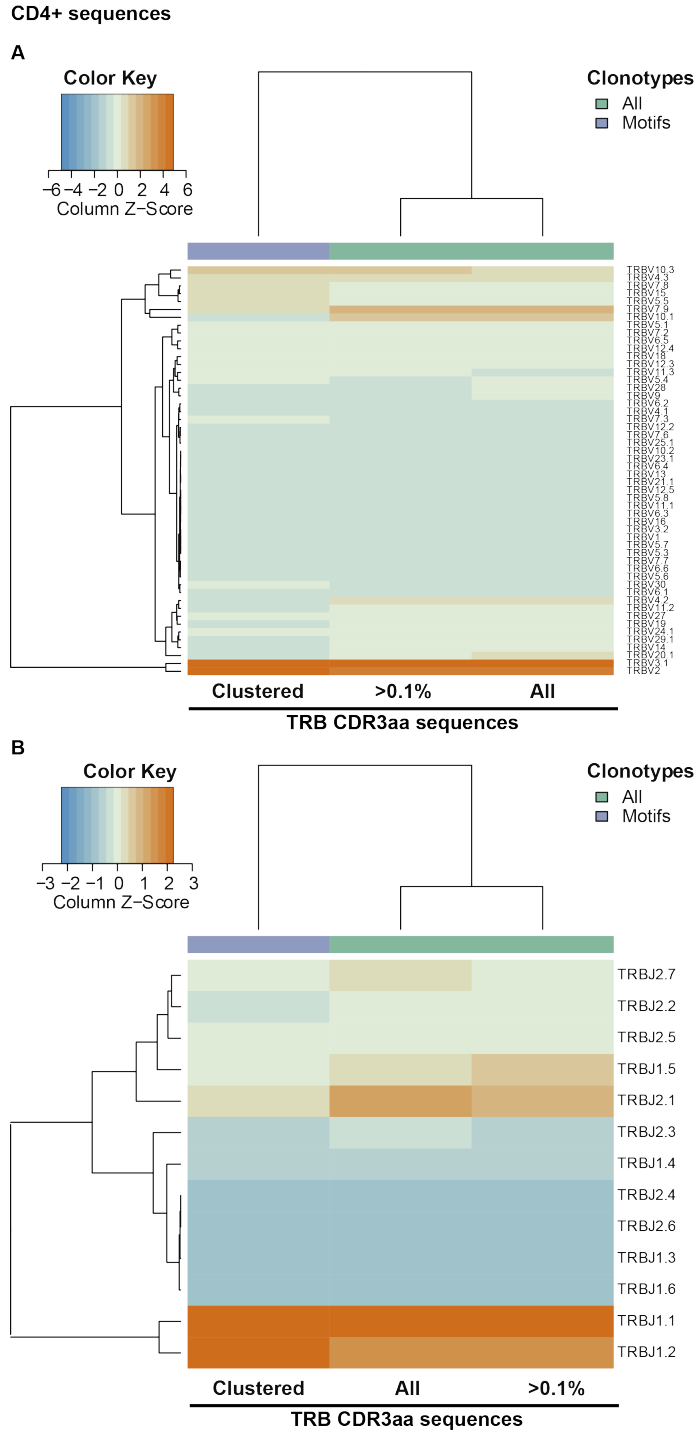


Figura 36. Uso y agrupamiento de los segmentos V y J de las secuencias del grupo de muestras CD4+. Se muestra el uso y frecuencia de los segmentos V (A) y J (B) y en los grupos de secuencias totales, superiores al 0.1 % y agrupados por motivos.

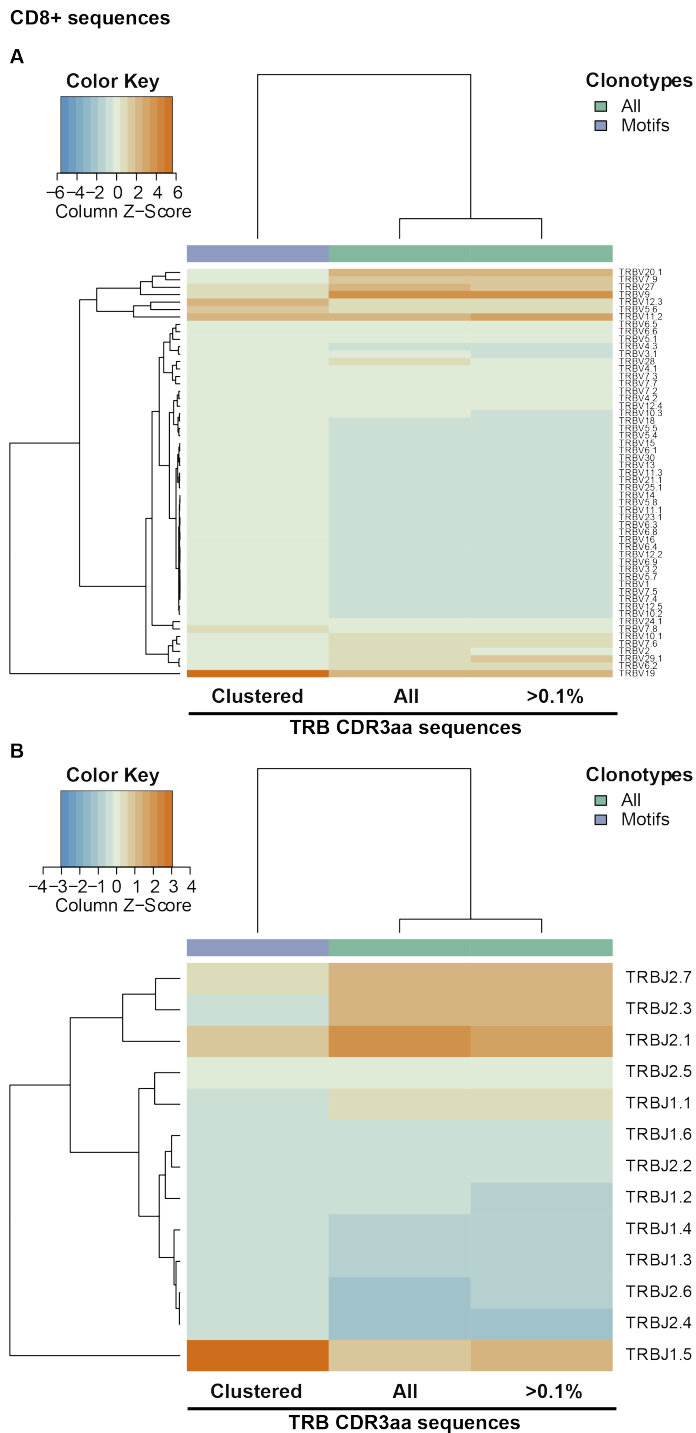


Figura 37. Uso y agrupamiento de los segmentos V y J de las secuencias del grupo de muestras CD8+. Se muestra el uso y frecuencia de los segmentos V (A) y J (B) y en los grupos de secuencias totales, superiores al 0.1 % y agrupados por motivos.

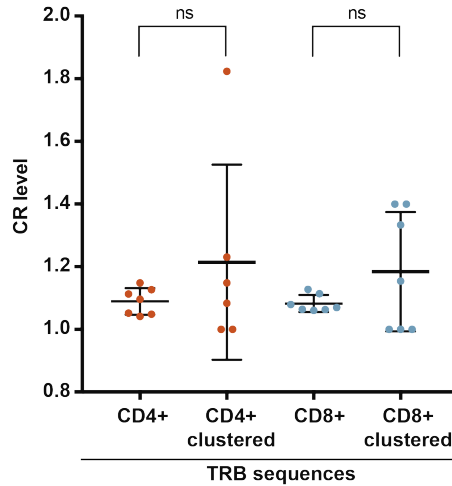


Figura 38. Nivel CR de las secuencias agrupadas por motivos, en comparación con el total de secuencias, en los grupos de muestras CD4+ y CD8+. No se observaron diferencias significativas.

2.2.6. Uso de los motivos CDR3 TRB como herramienta para identificar T-TIL específicos de tumor

Los datos previos confirmaron que los T-TIL CD4+ eran más homogéneos, especialmente considerándolos individualmente por paciente, aunque también sugerían una mayor similitud y homogeneidad entre pacientes. No sólo esto, sino que las secuencias incluidas en los *clusters* mostraron perfiles V y J más parecidos a los globales. Posteriormente, se comprobó si usando estos clones seleccionados por el *clustering* se podían obtener mejores resultados en la búsqueda de clones T específicos de cáncer. Los clones se buscaron usando la base de datos McPASTCR²⁸⁹ (ver página 66), que permite encontrar clones descritos en la literatura, usando una distancia de Levenshtein⁶ de 1. Se compararon los resultados obtenidos de la búsqueda usando tres grupos de secuencias: las secuencias con una frecuencia >0.1 %; las secuencias públicas; y las secuencias encontradas en el análisis de motivos. Los resultados de la búsqueda se agrupan en cuatro categorías según el tipo de respuesta en la que las secuencias han sido reportadas – alergia, autoinmunidad, cáncer y patógenos. Posteriormente, se hizo una anotación manual de secuencias, esto es, si una secuencia formando parte de un motivo se encontraba descrita en cáncer en la base de datos, se anotaron todo el resto de las secuencias del mismo motivo como posibles secuencias específicas de tumor.

⁶ La distancia de Levenshtein es el resultado de la suma de inserciones, deleciones o sustituciones entre dos secuencias, en este caso entre la secuencia consultada y las secuencias descritas en la bibliografía.

Usando las secuencias agrupadas por motivos se identificaron cinco y seis secuencias descritas anteriormente en cáncer, en los grupos CD4+ y CD8+, respectivamente (Figura 39 y Tabla 9). En el caso de las CD4+ este resultado es mayor que mediante el uso de secuencias de alta frecuencia o públicas. Entre las secuencias de las muestras CD8+, se encontraron más secuencias entre aquellas con una frecuencia >0.1 %. A pesar de que el número de secuencias seleccionadas en los *clusters* de las muestras CD4+ era casi el doble que los de las CD8+ – 126 *vs.* 62 – el número de secuencias encontradas en la literatura fue mayor en estas últimas: cinco *vs.* seis. En parte, esto podría ser consecuencia de que la mayoría de los estudios en cáncer, en general, se centran en la búsqueda de los LT CD8+, debido a su función citotóxica.

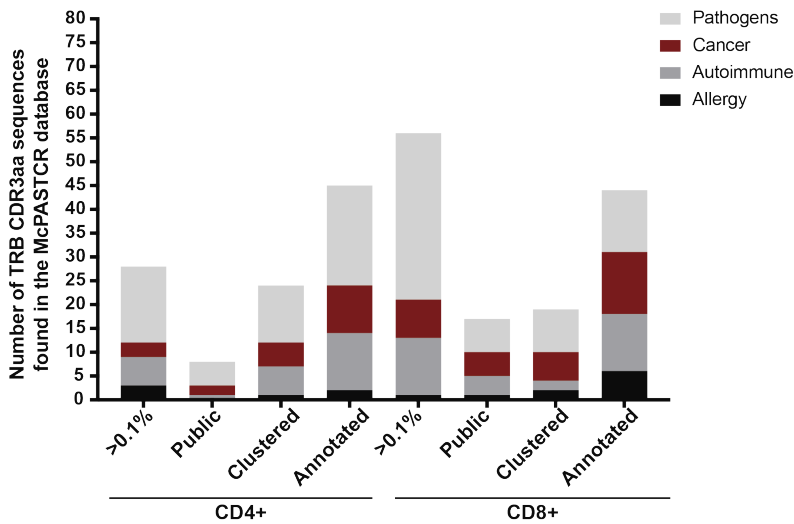


Figura 39. Número de secuencias TRB encontradas en la base de datos McPASTCR. Se buscaron en la base de datos los siguientes grupos de secuencias: secuencias mayoritarias (con frecuencias superiores al 0.1 %), secuencias públicas, secuencias agrupadas por motivos y secuencias anotadas manualmente según los motivos. Se muestran las secuencias encontradas con una distancia de Levenshtein 1, mostrando la especificidad reportada en la base de datos por grupos (patógenos, cáncer, autoinmunidad y alergia).

Posteriormente, se realizó una anotación manual, de modo que se consideraron como posibles secuencias específicas de cáncer aquellas que se encontraban en un mismo motivo que las secuencias identificadas en la base de datos. Usando este método, las secuencias en esta categoría aumentaron a 10 y 13 secuencias, en los grupos CD4+ y CD8+, respectivamente. Por lo tanto, el uso de los motivos ofrece una ventaja como método de selección, incrementando el número de clones candidatos, especialmente relevante para LT CD4+ debido a la escasez de secuencias publicadas.

Tabla 9. Secuencias TRB CDR3aa usadas para la búsqueda en la base de datos McPASTCR y resultados obtenidos en cada subgrupo de muestras.

Respuesta reportada de las secuencias encontradas ^b		Total
--	--	-------

Grupo de muestras y número total de secuencias CDR3aa	Subgrupo de secuencias CDR3aa	Número de secuencias CDR3aa en el subgrupo ^a	Alergia	Autoinmunidad	Cáncer	Patógenos	
CD4+ (8313)	>0.1 %	94	3	6	3	16	28
	Públicas	17	0	1	2	5	8
	Agrupadas por motivo	126	1	6	5	12	24
	Agrupadas por motivo + anotadas	126	2	12	10	21	45
CD8+ (4863)	>0.1 %	153	1	12	8	35	56
	Públicas	12	1	4	5	7	17
	Agrupadas por motivo	62	2	2	6	9	19
	Agrupadas por motivo + anotadas	62	6	12	13	13	44

^aNúmero de secuencias introducidas en la base de datos de los tres subgrupos: secuencias con frecuencia >0.1 %, secuencias públicas y secuencias agrupadas por motivo.

^bNúmero total de secuencias en función del tipo de respuesta en el que se había descrito: alergia, autoinmunidad, cáncer o respuesta a patógenos.

Las casillas en gris muestran la ampliación manual realizada mediante la anotación de secuencias pertenecientes a un mismo *cluster* que las secuencias encontradas en la base de datos McPASTCR²⁸⁹.

Entre las secuencias identificadas en cáncer mediante el uso de los motivos y la posterior anotación, ninguna de ellas ha sido reportada en cáncer de mama. Sin embargo, dos y cinco secuencias han sido descritas como neoantígeno-específicas, en los grupos CD4+ y CD8+, respectivamente (Figura 40A, Figura 40C).

En general, en cada motivo, se encontró una secuencia predominante, mientras que el resto se encontraron en bajos porcentajes. No necesariamente la secuencia más frecuente era la descrita en la bibliografía (Figura 40B, Figura 40D), como en el caso de la secuencia CASTPNYSNQPQHF encontrada en el grupo CD8+ y la biopsia Q1 (Figura 40D) conteniendo el motivo %NYSNQP.

Dos de los cuatro motivos, en el grupo de muestras CD4+, contenían secuencias encontradas en dos biopsias distintas (Figura 40B). Por el contrario, en el grupo de

Capítulo II. Resultados

muestras CD8+, cada agrupamiento de secuencias estaba formado por secuencias de una misma biopsia (Figura 40D).

Aunque después del proceso de agrupamiento por motivos y búsqueda en la base de datos se encontraron pocas secuencias descritas previamente en la respuesta al cáncer, este método permitió hacer una búsqueda de más clones que usando las secuencias públicas, mejorando el número de resultados obtenidos. Además, en el caso de las muestras CD4+, se encontraron más secuencias relacionadas con cáncer usando los motivos que usando las secuencias >0.1 %. Por lo tanto, el uso del análisis por motivos podría ser especialmente útil para encontrar clones CD4+ específicos de tumor.

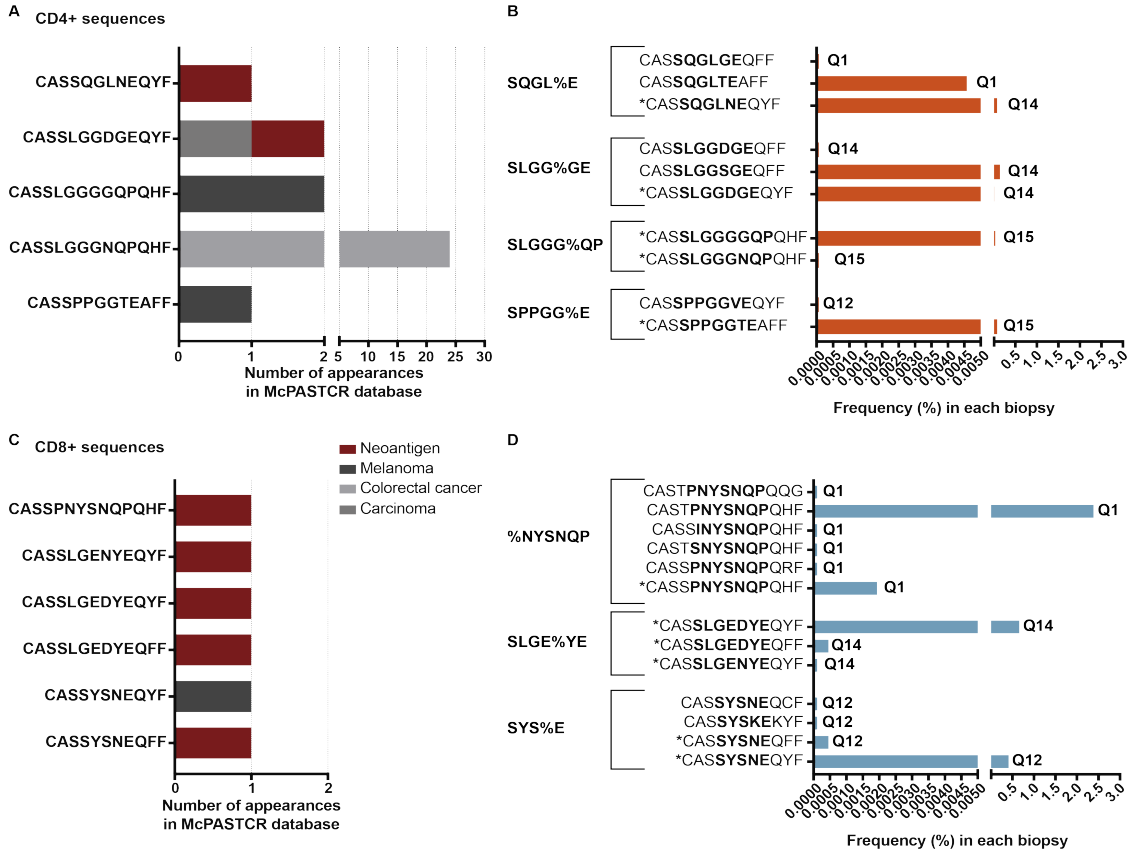


Figura 40. Secuencias presentes en los grupos de muestras CD4+ y CD8+, descritas anteriormente en la literatura como cáncer-específicas. Cinco y seis secuencias habían sido descritas como cáncer-específicas, en el grupo de muestras CD4+ (A) y CD8+ (C), en las que se encuentran dos y cinco secuencias reportadas en respuesta a neoantígenos, respectivamente. Las secuencias agrupadas por motivos que contienen alguna de las secuencias encontradas en la base de datos (marcadas con un asterisco) y sus frecuencias en las biopsias en las que se encontraron, del grupo de muestras CD4+ (B) y CD8+ (D).

2.3. Discusión

La mayoría de los estudios del repertorio de TCR están focalizados en su valor pronóstico o predictivo, tanto de evolución de la enfermedad como de respuesta a tratamientos. Sin embargo, hay muy poca información sobre las diferencias entre los repertorios en las distintas subpoblaciones de LT. Por este motivo, uno de los propósitos de este estudio fue comparar los repertorios de TCR de los T-TIL CD4+ y CD8+ expandidos *in vitro*.

El motivo por el cual se usaron T-TIL expandidos fue, principalmente, el bajo número de células que se obtienen de las biopsias de cáncer mama. Una cantidad limitada de células T no permite hacer una separación mediante *sorter* para, seguidamente, obtener una librería de sus TCR para secuenciar. Sin embargo, esto no es una limitación exclusiva en nuestro caso, sino extendida a todos los grupos, así como a la mayoría de los tipos de cáncer. No sólo esto, sino que la mejora de los métodos de detección precoz, así como de los tratamientos pre-cirugía, están produciendo que los tumores en el momento de la extirpación sean cada vez de un menor tamaño. Si bien es cierto que existen cada vez más alternativas que permiten trabajar con un bajo número de células obteniendo mucha información, como es el *single-cell sequencing*, éstas todavía no permiten la secuenciación de un número comparable de secuencias al que se obtiene con librerías clásicas creadas por ARN o ADN. Por este motivo, valoramos realizar el estudio de T-TIL expandidos *in vitro*, puesto a que podría ser una práctica cada vez más usada. Con el objetivo de determinar si las expansiones *in vitro* modificaban el repertorio, sesgando los resultados, se compararon con los de las muestras de cultivos iniciales y se incluyó un estudio control con LT periféricos de donantes sanos.

Se analizaron varias características de las secuencias CDR3 en los grupos de muestras iniciales, CD4+ y CD8+ de las cuales se sacaron varias conclusiones. En primer lugar, se observó un menor tamaño de las secuencias TRB NDNnt en las muestras del grupo CD8+, comparado con el del CD4+. Es sabido que el CDR3 es sometido a un proceso de acortamiento de secuencia durante el desarrollo tímico, que podría, en parte, estar relacionado con la restricción del MHC, entre otros³⁴². Aunque el CDR3 supuestamente sufra este acortamiento en todos los timocitos, algunos estudios han demostrado un acortamiento diferencial entre los dos linajes³⁴³, pudiendo estar relacionado con diferencias entre la interacción TCR-péptido en los surcos de unión de las moléculas de MHC de clase I y de clase II. Por otro lado, los autores Hou et al.³³² compararon el tamaño del CDR3 en las subpoblaciones CD4+ y CD8+ en periferia y concluyeron que las secuencias TRB CDR3 eran significativamente más largas en los LT CD8+ que en los CD4+. A pesar de que nuestros datos indicaran lo opuesto, el sistema inmune en periferia es un escenario totalmente distinto del microambiente intra-tumoral, ya que los T-TIL son células previamente activadas en

los linfonodos que han migrado al sitio del tumor. De hecho, el mismo estudio concluyó que el repertorio de LT naïve presentaba secuencias TRB CDR3 de mayor tamaño comparado con las células de memoria. Pese a que esto debería ser evaluado en más profundidad, sí prueba que nuestros datos no necesariamente son contrarios a los de dicho estudio. En cualquier caso, las diferencias en el tamaño del CDR3 podrían estar relacionadas con diferencias estructurales del TCR, a su vez conectadas con variaciones en la afinidad por los complejos p-MHC-I y p-MHC-II.

En cuanto a las propiedades bioquímicas de las secuencias CDR3aa estudiadas – hidropatía, polaridad y carga – solamente se observó una diferencia significativa en la última; concretamente, las secuencias de las muestras CD8+ presentaron una frecuencia mayor en el uso de aminoácidos con cadenas lateras de carga negativa. Esta propiedad ha sido previamente descrita en LT periféricos por otro grupo, concluyendo que los LT CD4+ presentaban en sus secuencias TRB CDR3 una proporción mayor de residuos con carga positiva (generalmente, lisina y arginina), mientras que los LT CD8+ contenían un mayor porcentaje de aminoácidos con carga negativa (sobre todo, ácido aspártico)³³³. Además, en nuestro estudio control con LT periféricos de donantes sanos, también se observaron la misma diferencia en la carga de las secuencias TRB. Esta diferencia incrementó tras las expansiones, aunque cuando se estudió si la carga global variaba antes y después de los cultivos *in vitro*, no se encontraron diferencias significativas. En conjunto, se puede concluir que la distinta carga en la región TRB es intrínseca a las subpoblaciones CD4+ y CD8+, aunque la razón de este uso diferencial es desconocida.

Dado que no se encontraron diferencias en el resto de las propiedades (hidropatía y polaridad), en un futuro podría ser útil hacer un estudio de las frecuencias de uso de aminoácidos concretos. No está claro cómo el uso de ciertos aminoácidos puede estar involucrado en la especificidad del TCR y, hoy en día, lo que se sabe de la interacción del TCR con los complejos p-MHC a nivel conformacional se basa en unos cuantos modelos concretos. Sin embargo, el estudio de las propiedades bioquímicas ha sido recientemente considerado para mejorar las predicciones en la especificidad de unión³⁴⁴. Ciertos aminoácidos confieren propiedades a las secuencias que pueden ser necesarias para un buen reconocimiento, i. e., se sabe que el uso aminoacídico no es aleatorio y se ha reportado que ciertas propiedades son observadas en una de las dos cadenas del TCR más que en la otra. Como ejemplo, es sabido que la glicina ayuda a la flexibilidad de los bucles formados en el CDR3 – lo cual se ha propuesto que pueda tener relación con secuencias más propensas a la poliespecificidad – y se ha descrito que el porcentaje de glicinas es mayor en las cadenas CDR3 β , aunque también se ha reportado que su uso incrementa de modo dependiente a la longitud de las secuencias, tanto en CDR3 α como en CDR3 β ^{345–347}. La asociación entre aminoácidos y las propiedades que confieren al TCR no está clara, pero su estudio podría llegar a dar información sobre el reconocimiento.

En segundo lugar, se realizó un estudio del repertorio de TCR en términos globales. Para ello, se estudió el nivel de convergencia, la diversidad y la frecuencia de secuencias públicas en los grupos de T-TIL CD4+ y CD8+, así como en LT periféricos de donantes sanos. No se encontraron diferencias significativas en el nivel de convergencia entre CD4+ y CD8+, ni en los T-TIL ni en los LT periféricos. En el análisis de los T-TIL, este estudio se realizó tanto por una misma sección como por varias secciones de una misma biopsia. En el estudio de las secuencias TRA se obtuvieron resultados globales muy similares, sin embargo, en el análisis de las secuencias TRB por biopsia, el nivel de convergencia encontrado fue mucho mayor, especialmente en los grupos CD4+ y CD8+. Esto sugiere una cierta selección de clones con las mismas secuencias CDR3aa durante las expansiones *in vitro*. Sin embargo, se observó cuando se miró en el conjunto de la biopsia y no por sección, indicando que en cualquier caso ciertos clones convergentes se encontraban en distintas secciones. Por otro lado, en periferia no se encontraron diferencias significativas entre las muestras antes y después de las expansiones, probablemente debido a la alta diversidad que se encuentra en el repertorio periférico. Es decir, que este efecto se incrementa cuando se expanden muestras originalmente ya sesgadas o con una cierta selección, como es el caso de los linfocitos infiltrantes.

En cuanto a la diversidad, no se encontraron diferencias entre las muestras de T-TIL de los cultivos iniciales y expandidos, por lo que el método de cultivo *in vitro* usado no producía una pérdida considerable en la diversidad. En el estudio periférico, la diversidad tampoco se alteró significativamente tras las expansiones. Sin embargo, se observó una mayor diversidad en las muestras del grupo CD8+, tanto en las secuencias TRA como en las TRB, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el primer capítulo, en los cuáles se asoció un mayor porcentaje de T-TIL CD4+ a una menor diversidad.

En CM, hasta la fecha, existen pocos estudios en los que se analice la diversidad y estos presentan resultados contradictorios. Algunos autores han reportado que la diversidad intra-tumoral es mayor en el tumor comparado con los tejidos sanos³⁴⁸, mientras que otros han observado repertorios menos diversos³⁴⁹. En cuanto a su valor pronóstico, se ha descrito que pacientes con bajo número de linfocitos combinado con una baja diversidad, presentan un riesgo más elevado de muerte temprana²⁴¹, lo cual iría en concordancia con las conclusiones en otros tipos de tumores. Existen pocos estudios publicados en los que se compare la diversidad entre los subtipos CD4+ y CD8+, y, de nuevo, la mayoría de ellos han sido evaluados en periferia, en los cuales se ha demostrado una mayor diversidad de LT CD4+^{332,333}. En cáncer, se han descrito resultados similares en adenocarcinoma pulmonar³⁵⁰ pero, hasta donde sabemos, esto no ha sido evaluado en CM con anterioridad. En cuanto a otros subgrupos celulares, y como es lógico, se ha reportado un repertorio naïve periférico más diverso comparado con el observado en Tm^{332,340,351}.

Capítulo II. Discusión

Considerando nuestros resultados, existen varias posibilidades que explicarían un repertorio de T-TIL CD8+ más diverso. La primera sería un mayor porcentaje de LT naïve en este subtipo celular y que muchas de estas células fueran, en realidad, *bystander cells*, i. e., células que llegan acompañando el infiltrado pero que no han sido previamente activadas o han reconocido antígenos. No se han estudiado los marcadores fenotípicos de memoria y de células naïve en nuestras muestras de TIL para su comprobación. La segunda explicación sería la propia naturaleza menos proliferativa de los LT CD8+ en comparación con los CD4+. A pesar de que no se encontraran diferencias con las muestras de cultivos iniciales, las células usadas para las expansiones se recogieron más tarde en el cultivo inicial. En ese margen de tiempo, ciertos LT CD4+ podrían haber empezado a proliferar más rápidamente que los LT CD8+, mostrando una pérdida de la diversidad. En tercer lugar, una mayor clonalidad en el grupo de LT CD4+ podría indicar un mayor reconocimiento comparado con el de los LT CD8+. Esta última posibilidad fue estudiada en mayor profundidad.

El primer análisis realizado fue determinar si los clones CD4+ expandidos eran públicos, es decir, presentes en más de una biopsia y se concluyó que éstos no eran más abundantes entre las células CD4+ que en las CD8+. Se observó un mayor número de secuencias TRA públicas, aunque el número de secuencias en alta frecuencia (mayor a 0.005) fue similar en las TRA y las TRB. En estudios anteriores, se determinó que las secuencias públicas en CM presentaban una convergencia mayor³³⁴ y, en nuestro caso, también se observó que prácticamente todas las secuencias públicas eran convergentes, aunque no hubo una diferencia notable entre subtipos CD4+ y CD8+. Además, tampoco se observó que los clones públicos se encontraran en altas frecuencias. Es importante remarcar que, anteriormente, se encontró una convergencia mayor entre secuencias TRB, pero un menor número de secuencias públicas, indicando que, pese a que se tiende a la convergencia, esta es dependiente de biopsia.

En resumen, la selección de ciertos clones de T-TIL CD4+, dando como resultado una baja diversidad, no parecía tener su origen en una mayor convergencia ni en una mayor expansión de secuencias públicas. Por ello, se podía suponer que las expansiones en cada paciente eran distintas e independientes al tipo de tumor de mama.

Por todo esto, el siguiente análisis y correspondiente a la segunda parte del capítulo, se focalizó en el estudio de motivos en las secuencias CDR3 con el fin de encontrar secuencias similares, aunque no idénticas, en distintos grupos. La aproximación basada en el uso de motivos se ha descrito anteriormente en varios tipos de patologías como autoinmunidad³⁵² o infección^{291,353}, para la identificación de TCR específicos. Se encontraron más motivos en el grupo CD4+, formados por más secuencias y más compartidos, en comparación con el grupo CD8+. Así pues, una menor inter e intra-similitud en los repertorios de las muestras CD8+, concordaría con la mayor

diversidad observada, es decir, los clones de T-TIL CD8+ parecen ser más diversos y diferentes entre ellos. Cabe remarcar que en las muestras CD8+ se encontraron más motivos en las biopsias TN. Esto podría estar relacionado con un mayor reconocimiento en este tipo de tumores, reforzado por el hecho de que los tumores TN son más inmunogénicos y presentan una carga mutacional mayor³⁵⁴⁻³⁵⁶.

Se buscaron las secuencias agrupadas en los *clusters* en la base de datos para asociarlas a un posible reconocimiento antigénico. La búsqueda de las secuencias agrupadas en los *clusters* en la base de datos McPASTCR²⁸⁹ se vio sesgada por el número de secuencias introducidas. Además, el mayor número de publicaciones enfocadas a la investigación de LT CD8+ también descompensó los resultados obtenidos. Sin embargo, se comprobó que los motivos también tenían utilidad para hacer anotaciones manuales de secuencias putativamente específicas de tumor, especialmente entre las de los LT CD4+ o de LT CD8+ en TN.

El mayor número de motivos encontrado en los T-TIL CD4+ indica una mayor similitud entre sus TCR en distintos individuos, lo cual sugiere una propiedad intrínseca a su naturaleza. Por ello, varios TCR similares podrían reconocer múltiples p-MHC ligeramente distintos. La gran variabilidad del repertorio de TCR, así como la complejidad de sus interacciones con los complejos p-MHC, dificulta su estudio. Sin embargo, es plausible pensar que una mayor similitud de TCR llevaría a una mayor predisposición a la reactividad cruzada en LT CD4+ comparado con los LT CD8+. Esto podría venir dado por una diferente composición del ligandoma de las moléculas de HLA de clase II y clase I, respectivamente, ejerciendo roles distintos en la selección. Por ello, es necesario entender la contribución de los péptidos presentados por una u otra vía. La continuación de este estudio se enfocó en la caracterización del peptidoma presentado por distintos alelos de HLA-DR, para determinar si podría contribuir de forma distinta a la generación de LT CD4+ expandidos con secuencias parecidas.

2.4. Figuras suplementarias

Figura suplementaria 5. Correlación de los índices de diversidad obtenidos en las secuencias TRA y TRB. Las regresiones lineales mostraron una correlación significativa de los índices de diversidad nS-W en los grupos de CD4+ (A) y CD8+ (B) ($p < 0.0001$).

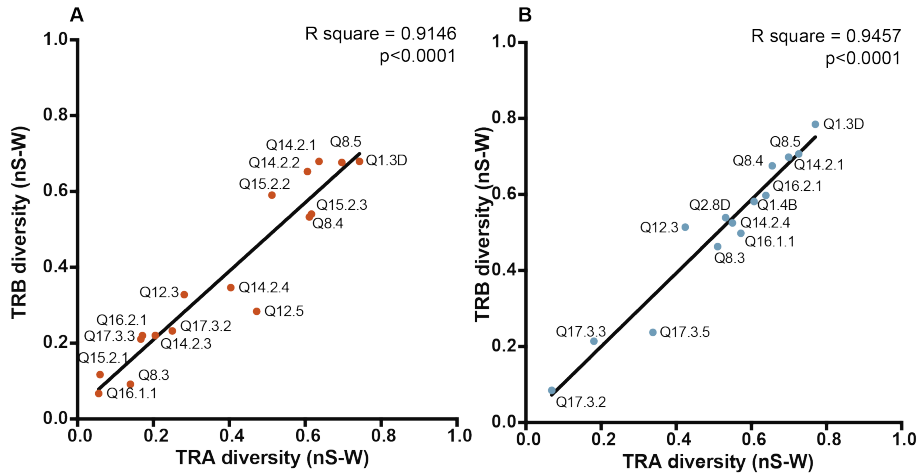


Figura suplementaria 6. Efecto de la expansión *in vitro* en las propiedades de las secuencias TRB analizadas en LT periféricos CD4+ y CD8+ de donantes sanos. Se estudiaron las mismas propiedades de las secuencias TRB analizadas en el repertorio de T-TIL (tamaño del CDR3nt, tamaño de la región NDNnt, hidropatía, carga y polaridad). Se compararon los resultados antes y después de las expansiones *in vitro*, en tres grupos de muestras (PBMCs, LT CD4+ y LT CD8+). No se observaron diferencias significativas en ninguna de las propiedades estudiadas, indicando que las expansiones *in vitro* no habían sesgado las muestras.

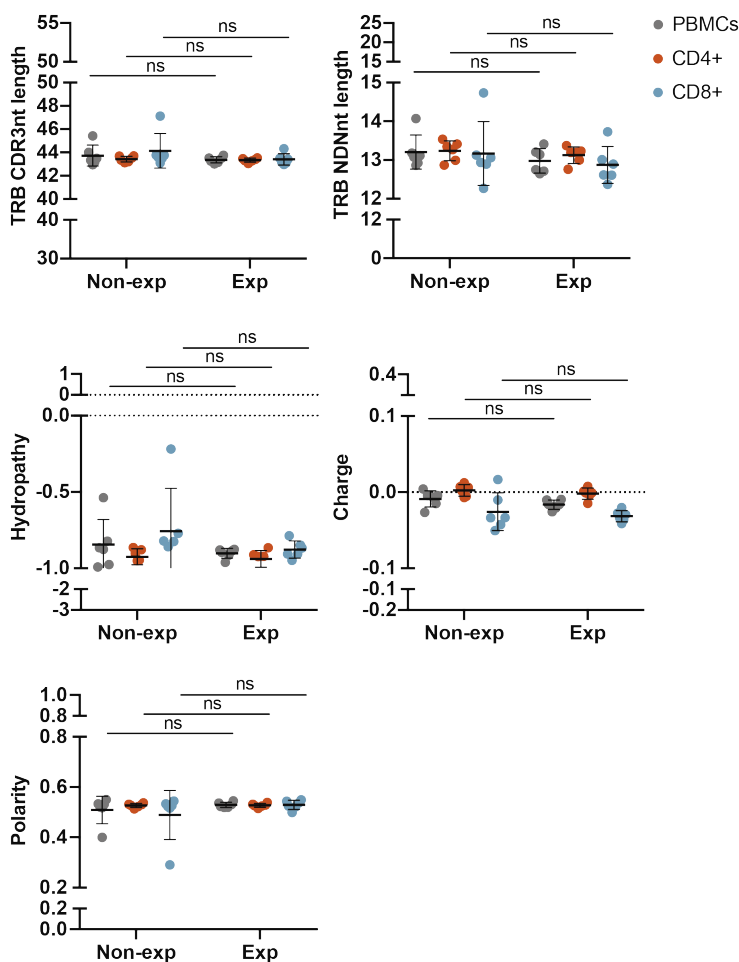


Figura suplementaria 7. Comparación de las propiedades de las secuencias TRB analizadas entre LT CD4+ y CD8+ periféricos de donantes sanos y T-TIL xpandidos. Se estudiaron las mismas propiedades de las secuencias TRB analizadas en el repertorio de T-TIL (tamaño del CDR3nt, tamaño de la región NDNnt, hidropatía, carga y polaridad). Se compararon los grupos de muestras CD4+ y CD8+ procedentes de LT periféricos de donantes sanos con los procedentes de T-TIL. No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las propiedades estudiadas.

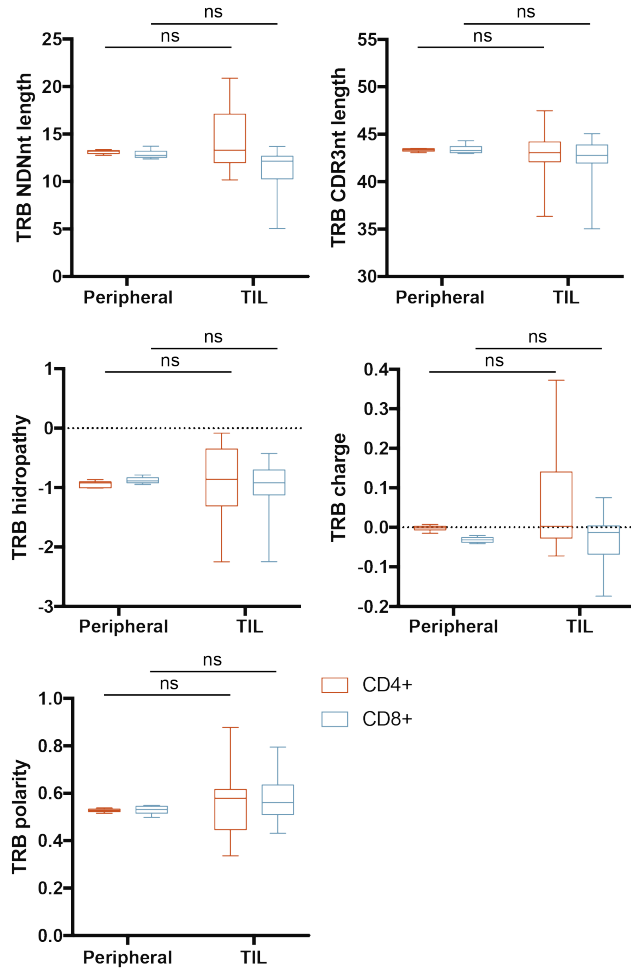


Figura suplementaria 8. Propiedades de las secuencias TRB entre LT CD4+ y CD8+ sin diferencias significativas entre grupos. Se confirmó que tampoco existía diferencia significativa en aquellas propiedades en las que no se habían observado diferencias entre T-TIL CD4+ y CD8+ (tamaño del CDR3nt, hidropatía y polaridad).

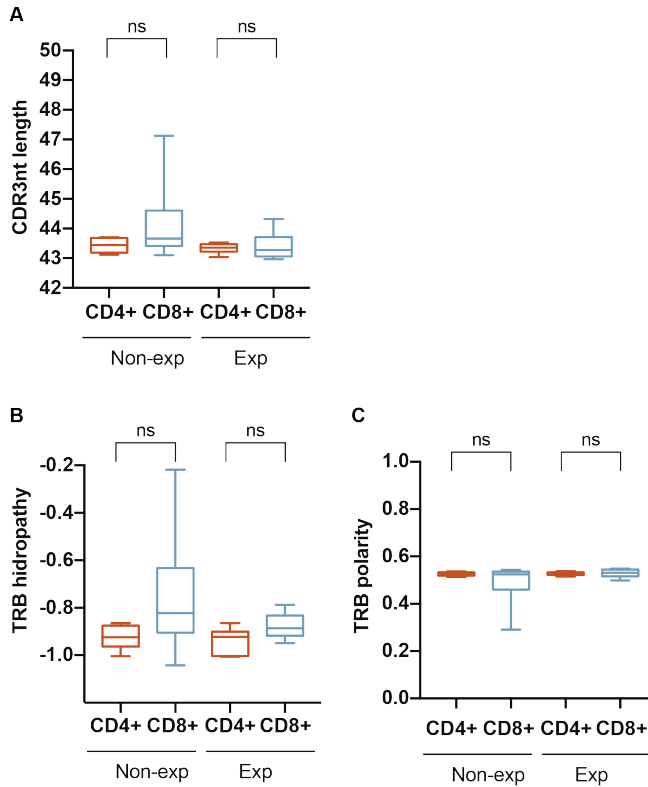


Figura suplementaria 9. Efecto de la expansión *in vitro* en el nivel CR y la diversidad del repertorio de secuencias TRB de LT periféricos CD4+ y CD8+ de donantes sanos. Se compararon los resultados antes y después de las expansiones *in vitro*, en tres grupos de muestras (PBMCs, LT CD4+ y LT CD8+). No se observaron diferencias significativas ni en el nivel CR ni en la diversidad, indicando que las expansiones *in vitro* no habían sesgado las muestras.

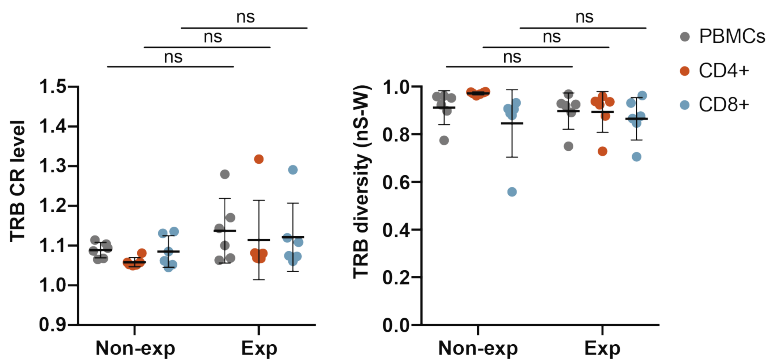
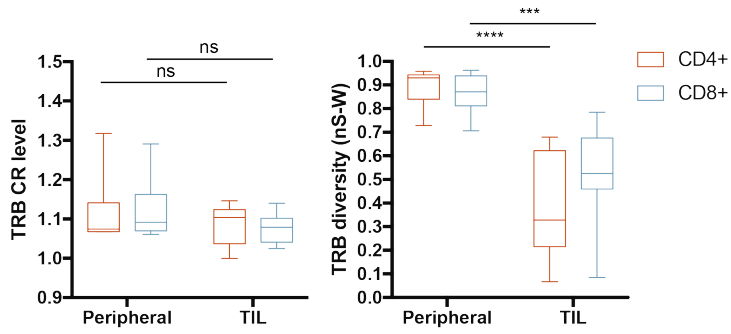


Figura suplementaria 10. Comparación del nivel CR y la diversidad del repertorio de secuencias TRB entre LT CD4+ y CD8+ periféricos de donantes sanos y T-TIL expandidos. Se compararon los grupos de muestras CD4+ y CD8+ en periferia (de donantes sanos) con los T-TIL. No se encontraron diferencias significativas en el nivel CR, pero sí en la diversidad, con una mayor diferencia en el grupo CD4+ ($p < 0.0001$) respecto al CD8+ (0.0006).



Capítulo III. Caracterización del repertorio de péptidos asociados a HLA-DR presentados por MoDCs pulsadas con extractos de una línea tumoral de cáncer de mama

3.1. Antecedentes

El estudio de los antígenos presentados en el contexto tumoral tradicionalmente se ha realizado mediante el análisis de péptidos presentados por MHC-I. Existen todavía hoy en día muy pocos estudios del peptidoma presentado por las moléculas de MHC-II en cáncer. Su expresión en el sitio del tumor está prácticamente relegada a la presencia de APC, pero el reconocimiento y activación de LT CD4+ es necesario para una buena orquestación y mantenimiento de la respuesta anti-tumoral. Por ello, es importante conocer qué péptidos conducen a una buena respuesta, aunque esto es complicado por varios motivos: el primero es el polimorfismo de las moléculas de HLA, el cual dificulta el uso de un solo péptido para un tratamiento generalizado; el segundo es la naturaleza propia de los tumores, es decir, la mayor parte de los péptidos presentados son procedentes de proteínas propias ante las cuales el sistema inmune se mantiene tolerante.

En este sentido, los neoantígenos han despertado un gran interés puesto a que pueden ser usados como diana debido a que añaden diferencias a las proteínas propias y, por lo tanto, pueden dar lugar a péptidos más inmunogénicos. Sin embargo, la mayoría de los estudios enfocados a la identificación de neoantígenos son realizados *in silico*, mediante predicción de péptidos generados por mutaciones. A pesar de que algunos de ellos pueden ser presentados, la complejidad del sistema de presentación antigénica puede dificultar su generación y presentación. Esto puede deberse, en parte, a la afinidad con las moléculas de HLA que contienen surcos de unión muy restrictivos. Incluso si estos llegan a presentarse y con el conocimiento actual, el resultado puede ser, a veces, inesperado. Si bien en algunos casos el uso de TCR específicos para neoantígenos han llevado a toxicidades letales debido a reactividades cruzadas con otros autoantígenos³⁵⁷, en otros casos la respuesta por parte de los LT puede ser independiente de la afinidad con la cual reconozcan dichos péptidos y dar lugar a respuestas distintas³⁵⁸.

Habitualmente, el estudio de péptidos asociados a tumor se realiza en alelos concretos que son frecuentes en la población. Sin embargo, hay muy pocos estudios de caracterización del peptidoma de forma transversal en distintos alelos y combinaciones alélicas, los cuales podrían ser útiles para determinar de qué modo y con qué frecuencia se presentan unas u otras proteínas en un conjunto de individuos con una misma patología e independientemente de la restricción del HLA. Se ha hipotetizado tanto en clase I como en clase II que la presencia de una pareja de moléculas de HLA en codominancia con restricciones más divergentes favorecería la presentación de un mayor abanico de antígenos, incrementado la inmunocompetencia, conocido como ventaja de divergencia alélica^{359,360}.

Por otro lado, el conocimiento del peptidoma presentado, no solamente tiene un interés en cuanto a la identificación de antígenos tumorales. Debido a que el HLA es

Capítulo II. Antecedentes

uno de los factores determinantes del repertorio de TCR, desde su selección en el timo hasta el condicionamiento de los péptidos que puedan ser presentados en el contexto tumoral, su caracterización de forma transversal puede ayudar a entender su influencia. Entender si la modulación ejerce el mismo grado de presión a la diversidad en el sitio del tumor cuando se expresan distintos alelos, e incluso distintos haplotipos, puede ayudar a la comprensión del repertorio de TCR como biomarcador.

Teniendo todo esto en cuenta, en este capítulo se ha realizado un análisis comparativo preliminar para determinar cuál es el inmunopeptidoma resultante de pulsar un mismo extracto en distintas muestras de MoDC expresando distintos alelos de HLA-DR. Para ello se ha usado un extracto de la línea de cáncer de mama MCF-7. Este estudio nos ha permitido caracterizar la influencia del peptidoma del extracto en la modificación del repertorio; ver el solapamiento de péptidos y las proteínas de las cuales derivan en distintos alelos y la influencia de la pareja de alelos expresados en codominancia.

3.2. Resultados

3.2.1. Análisis de solapamiento de los péptidos y sus proteínas de origen en ambos alelos de una misma muestra de MoDC

Con el objetivo de estudiar el repertorio de péptidos asociados a HLA-DR en MoDC, se hizo un primer estudio general del grado de solapamiento de péptidos y proteínas. Para ello, se cultivaron y diferenciaron MoDC procedentes de ocho donantes con distintos alelos (ver página 56). Seis muestras se pulsaron con la línea tumoral de mama MCF-7 y dos muestras se usaron sin pulsar como controles. Se compararon los péptidos obtenidos mediante inmunoprecipitaciones y analizados por espectrometría de masas. En primer lugar, se realizó un análisis de caracterización general de los repertorios obtenidos en cada muestra, estudiando la distribución por tamaño y la sublocalización celular. Seguidamente, se comparó el proteoma total obtenido de la línea tumoral MCF-7 con las proteínas encontradas en las muestras pulsadas y controles. Finalmente, se comparó qué porcentaje de péptidos y proteínas se encontraban asociadas a uno u otro alelo, o en ambos, en cada muestra de MoDC. La valoración de la afinidad de los distintos péptidos se realizó según las predicciones del NetMHCIIpan²⁹⁶.

En total, se obtuvieron 1865 péptidos distintos, derivados de 416 proteínas, en el conjunto de las 8 muestras de MoDC (Tabla 10) con bastante variabilidad entre muestras (des de 110 hasta 710 péptidos encontrados en la muestra con menor y la muestra con mayor número de péptidos, respectivamente). Entre los péptidos se encontraron varios *nested sets* – péptidos procedentes de la misma proteína que comparten una secuencia común con distintos residuos flanqueantes – una característica común de los péptidos asociados a HLA-DR.

Posteriormente, se excluyeron los péptidos duplicados – aquellos con secuencias iguales, pero con modificaciones post-traduccionales – se seleccionaron por tamaño (de 9- a 24-mer) y se excluyeron los péptidos derivados de queratinas. Tras este proceso de pre-filtrado, restaron un total de 1611 péptidos, derivados de 402 proteínas (Tabla 10). El tamaño de los péptidos restantes mostró una distribución normal cuando se miraron tanto en conjunto como de forma individual en todas las muestras (Figura 41A).

Se estudió la sublocalización celular de las 402 proteínas de origen de los péptidos encontrados usando la información obtenida en la base de datos Uniprot²⁹². En porcentaje, la sublocalización se corresponde con la de los péptidos presentados por las moléculas de HLA de clase II, los cuales son procesados por la vía endocítica. Sin embargo, en las muestras de MoDC pulsadas, se observaron algunas diferencias en porcentaje con las muestras control sin pulsar, i. e., un mayor porcentaje de péptidos procedentes de proteínas localizadas en el citosol, de proteínas secretadas o de matriz

Capítulo III. Resultados

extracelular, nucleares y de mitocondrias, así como una disminución en las proteínas de membrana, de lisosomas y endosomas, del aparato de Golgi y del retículo endoplasmático (Figura 41B).

Tras el primer pre-filtrado y corroborar que los datos obtenidos eran fiables por su distribución de tamaño y la localización subcelular de las proteínas de origen, se realizó un estudio del nivel de afinidad a los alelos de HLA-DR de cada muestra. Para ello, se analizaron las secuencias mediante la herramienta NetMHCIIpan²⁹⁶ (ver página 67). Se eliminaron los péptidos considerados sin afinidad para los alelos de HLA-DR distintos y se conservaron aquellos con una predicción de la afinidad tanto débil (WB, del inglés *weak binders*) como fuerte (SB, del inglés *strong binders*). Tras este análisis, restaron 1135 péptidos procedentes de 286 proteínas (Tabla 10, Anexos Tabla suplementaria 5).

Se evaluó qué parte del proteoma total de las células MCF-7 se encontraron en las muestras pulsadas y sin pulsar (Figura 42A). Notablemente, solamente una pequeña fracción se encontró en las células pulsadas (95 proteínas de las 1292), sin embargo, 78 se encontraron exclusivamente en las muestras pulsadas, aparte de 17 que eran compartidas por todas. Solamente dos proteínas se identificaron exclusivamente en los controles.

Con el fin de acotar cuáles eran las proteínas que procedían del extracto de la línea MCF-7, las proteínas presentes en las muestras de MoDC se clasificaron en cuatro categorías: (i) proteínas encontradas en el proteoma de las MCF-7 así como en los controles (muestras sin pulsar, DC19-21 y DC19-22); (ii) proteínas encontradas en el proteoma de las MCF-7 pero no en los controles; (iii) proteínas encontradas solamente en los controles y (iv) proteínas exclusivas de la muestra pulsada (Figura 42B). Del mismo modo, se miró qué porcentaje de proteínas encontradas exclusivamente en el proteoma de las MCF-7 o tanto en este como en alguna de las muestras pulsadas. En ambas muestras control, se observó un porcentaje muy bajo de proteínas encontradas exclusivamente en el proteoma de las MCF-7 (Figura 42C).

Como era esperable, una parte de las proteínas encontradas en las MCF-7 también se encontraron presentadas por las DC controles, puesto que ambas son células de origen humano y ciertas proteínas pueden encontrarse en ambos subtipos. Sin embargo, en todas las muestras pulsadas se observó un porcentaje de proteínas

exclusivas de las MCF-7 mayor que en los controles, que fue de entre un 9 % (DC19-7) y un 30 % (DC19-3).

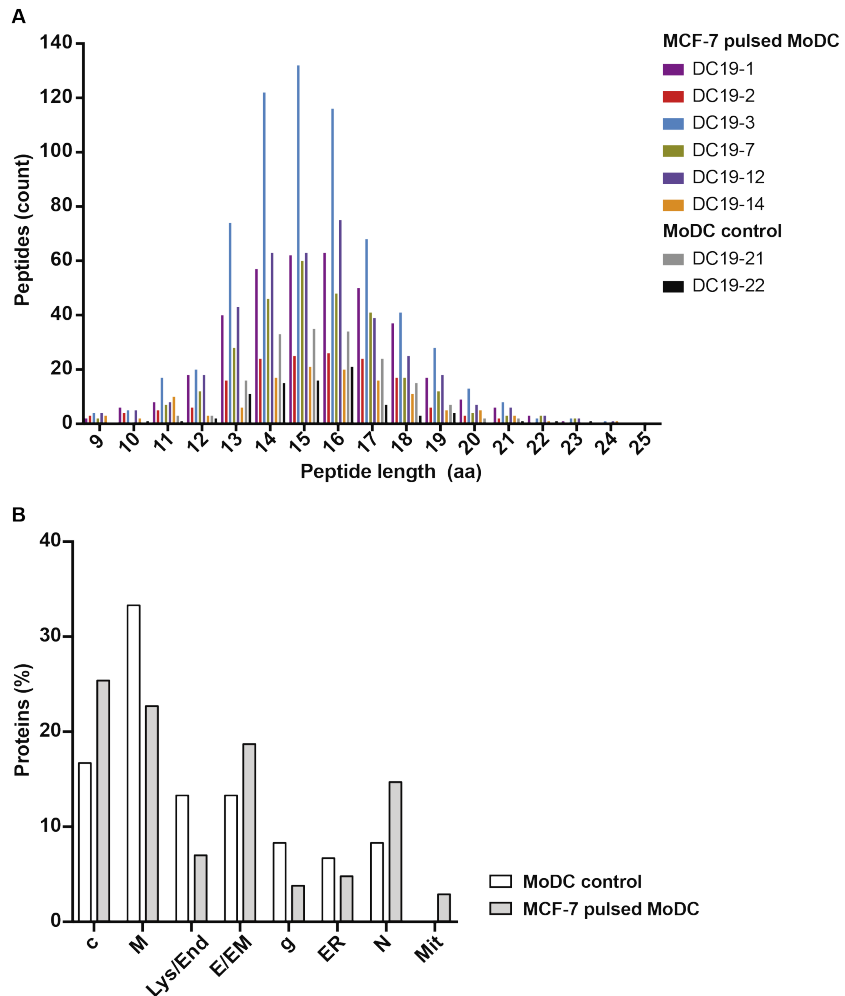


Figura 41. Distribución por tamaño de los péptidos eluidos de las moléculas de HLA-DR de las distintas muestras de MoDC y sublocalización celular de las proteínas de origen. (A) La distribución por tamaño de los 1611 péptidos pre-filtrados muestra una distribución Gaussiana. (B) La sublocalización celular de las 402 proteínas de origen, en porcentaje, según los datos obtenidos de la base de datos Uniprot, en las muestras pulsadas y en las muestras control. Se observa un crecimiento en el porcentaje de proteínas del citosol, secretadas y de matriz extracelular, nucleares y de mitocondrias en las muestras pulsadas, así como un decrecimiento de las de lisosoma y endosoma, del aparato de Golgi y de retículo endoplasmático. c, citosol; M, membrana; Lys/End, lisosoma y endosoma; E/EM, exógenos y matriz extracelular; g, Golgi; ER, retículo endoplasmático; N, núcleo; mit, mitocondria y; ND, no definidos.

Capítulo III. Resultados

Se miró el número de péptidos asociados a cada alelo con predicción de la afinidad fuerte (SB) o débil (WB) (Figura 43A). Considerando los péptidos tanto SB como WB, se miró el número y porcentaje de péptidos asociados a cada alelo, así como aquellos con afinidad para ambos (Figura 43). Se observó que ciertas muestras tenían muchos más péptidos asociados a un alelo que a otro (DC19-1, DC19-3, DC19-14 y DC19-21), mientras que otras tenían aproximadamente el mismo número asociado a cada alelo (DC19-2, DC19-7 y DC19-12). Los porcentajes de péptidos con afinidad para ambos alelos tuvieron valores de entre un 18 % (DC19-1) al 43 % (DC19-12).

Tabla 10. Número de péptidos obtenido de cada muestra de MoDC y número de péptidos pre-filtrados.

Muestra	Número péptidos totales	Número de péptidos pre-filtrados ^a	Número de péptidos con afinidad por los alelos de HLA ^b	Número de péptidos asociados a cada alelo ^b	
DC19-1	391	379	211	DR*03:01	198
				DR*13:01	52
DC19-2	187	161	58	DR*13:05	33
				DR*15:01	37
DC19-3	710	652	476	DR*04:04	435
				DR*13:02	163
DC19-7	316	285	232	DR*07:01	156
				DR*13:02	131
DC19-12	461	380	240	DR*03:01	158
				DR*13:03	187
DC19-14	174	124	59	DR*01:02	52
				DR*13:02	27
DC19-21	199	173	106	DR*13:01	33
				DR*13:02	102
DC19-22	110	84	53	DR*07:01	53
Total	1865	1611	1135		

^aEn los péptidos pre-filtrados se han eliminado queratinas, proteínas procedentes del SFB, y péptidos considerados sin afinidad según las predicciones del NetMHCIIpan 4.0²⁹⁶.

^bValores según la predicción de afinidad del NetMHCIIpan 4.0.

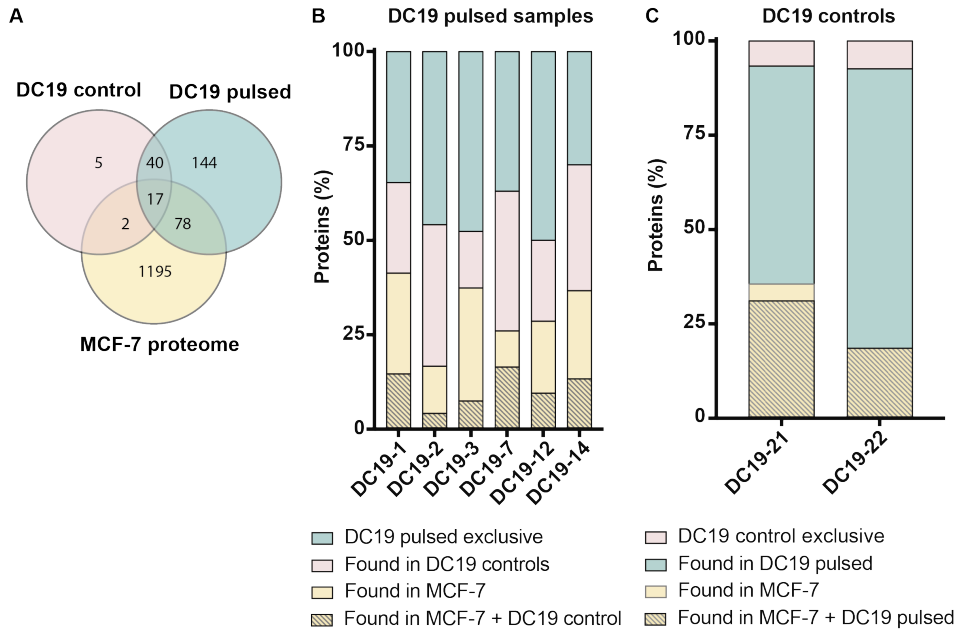


Figura 42. Porcentaje de proteínas encontradas en el proteoma de la línea MCF-7 y en las muestras sin pulsar. (A) Diagrama de Venn con el número de proteínas encontradas en común y exclusivas en las distintas muestras DC19 control, DC19 pulsadas y proteoma total del extracto de la línea MCF-7. (B) Se muestra el porcentaje de proteínas en las muestras pulsadas en las categorías: proteínas exclusivas de aquella muestra; proteínas encontradas en las muestras de DC control; proteínas encontradas en el proteoma total de la línea MCF-7 y proteínas encontradas tanto en los controles como en la línea celular. (C) Porcentaje de proteínas en las muestras no pulsadas en las categorías: proteínas exclusivas; proteínas encontradas en las muestras pulsadas; proteínas encontradas en el proteoma de las MCF-7 y proteínas encontradas tanto en el proteoma de las MCF-7 como en las muestras pulsadas. Se observó que el porcentaje de proteínas exclusivas del proteoma de las MCF-7 en los controles fue muy bajo, a diferencia del encontrado en las muestras pulsadas, indicando que las células pulsadas eran capaces de presentar proteínas encontradas en el extracto y que no se encontraban en los controles.

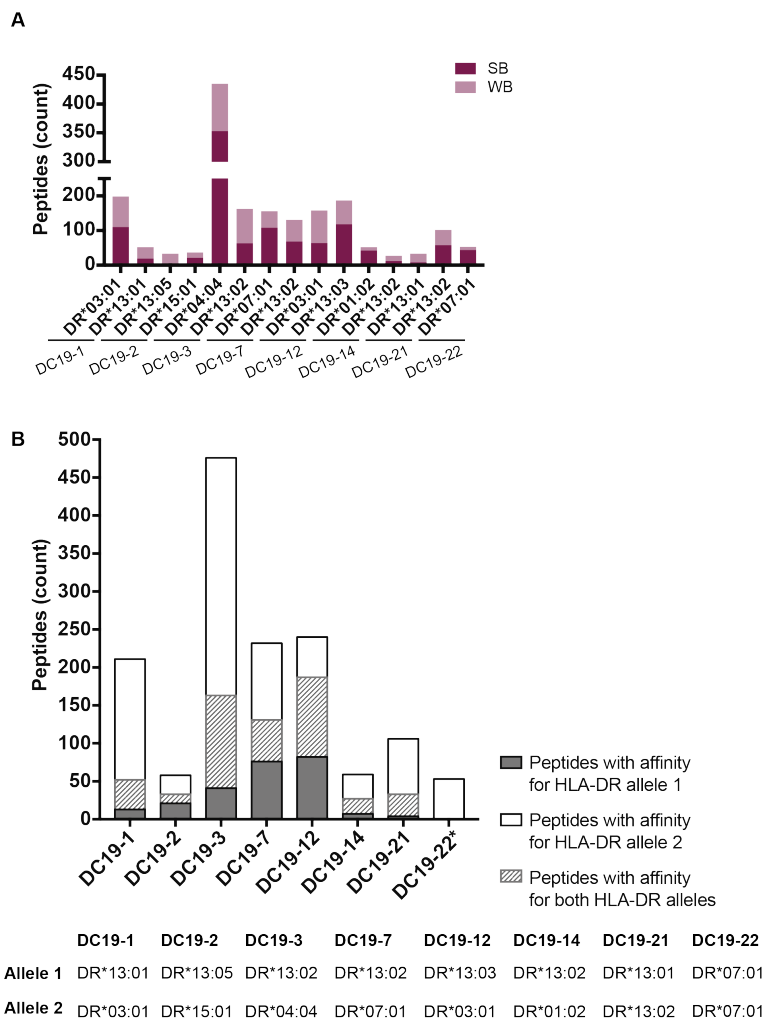


Figura 43. Número de péptidos con afinidad para cada uno de sus alelos. (A) Número de péptidos asociados a cada alelo con afinidad fuerte (SB) o débil (WB) en las distintas muestras estudiadas. (B) Valores absolutos de los péptidos asociados a cada uno de los alelos (tanto SB como WB), así como aquellos con afinidad para ambos alelos, según la predicción realizada mediante el NetMHCIIpan. *La muestra DC19-22 se muestra de un solo color debido a que su homocigosis del alelo HLA-DR (DR*07:01).

3.2.2. Análisis de solapamiento de los péptidos y las proteínas de origen en distintos alelos y muestras de MoDC

Tras la caracterización de los péptidos obtenidos, se estudió el grado de solapamiento de péptidos y proteínas encontradas en más de una muestra. Se compararon los péptidos asociados a un alelo en cada muestra con el resto de las muestras y se normalizaron los valores con el número total de péptidos obtenidos en cada muestra.

En primer lugar, se vio que las muestras con un bajo número de péptidos identificados mostraban un mayor solapamiento (Figura 44A), es decir, una mayor fracción de péptidos compartidos. En segundo lugar, se observó un patrón de solapamiento muy similar entre el de péptidos y proteínas, sugiriendo que los péptidos exclusivos de un alelo podrían proceder de proteínas distintas (Figura 44B). Por ejemplo, en la muestra DC19-3, se encontró una fracción muy alta de péptidos exclusivos en el alelo DR*04:04 (0.65) y muy baja en el alelo DR*13:02 (0.01). Del mismo modo, la fracción de proteínas exclusivas en el alelo DR*04:04 fue del 0.46 y del 0.01 en el alelo DR*13:02. A pesar de que las proteínas son fuente de más de un péptido, se mantiene un elevado porcentaje de proteínas únicas de ese alelo. Esta observación en la cual un alelo presenta una alta fracción de péptidos y proteínas exclusivas, mientras que el acompañante comparte casi en su totalidad el peptidoma, se observó en todas las muestras exceptuando la DC19-2 y las dos muestras control (DC19-21 y DC19-22). En estas últimas, la alta fracción de solapamiento con otras muestras (Figura 44A y Figura 44B), probablemente sea debido a que el ligandoma natural de las DC se mantiene también en el resto de las muestras a pesar del pulso.

Debido a que se obtuvo un número de péptidos muy distinto en algunas muestras, se estudió si podía estar afectando al grado de solapamiento. Para ello se miró si había correlación entre el número total de péptidos en la muestra y la fracción de péptidos compartidos, así como entre el número total y fracción de proteínas compartidas. Del mismo modo, y dado que varias muestras compartían alelos (DR*03:01 y DR*07:01 en dos muestras y DR*13:02 en cuatro muestras) se comprobó si existía una relación entre el número de alelos iguales en el subconjunto de muestras con el porcentaje de péptidos o proteínas compartidas.

En el primer caso, se observó que ni el número de péptidos ni de proteínas totales identificadas estaban correlacionados con las fracciones de péptidos y proteínas compartidas (Figura 45A), indicando que el solapamiento era independiente de los valores totales. Por el contrario, sí se encontró una correlación significativa entre las fracciones compartidas con el número de muestras con el mismo alelo en el subconjunto (Figura 45B); cuantas más muestras con el mismo alelo había en el *pool* con el que se comparaba, mayor era el solapamiento. Esto era esperable en el análisis de péptidos debido a las diferencias de afinidad de cada alelo, sin embargo, dado que también sucede con las proteínas, esto podría sugerir que el alelo también influye en

la proteína que se presenta, acorde con lo observado en el análisis del solapamiento (Figura 44B).

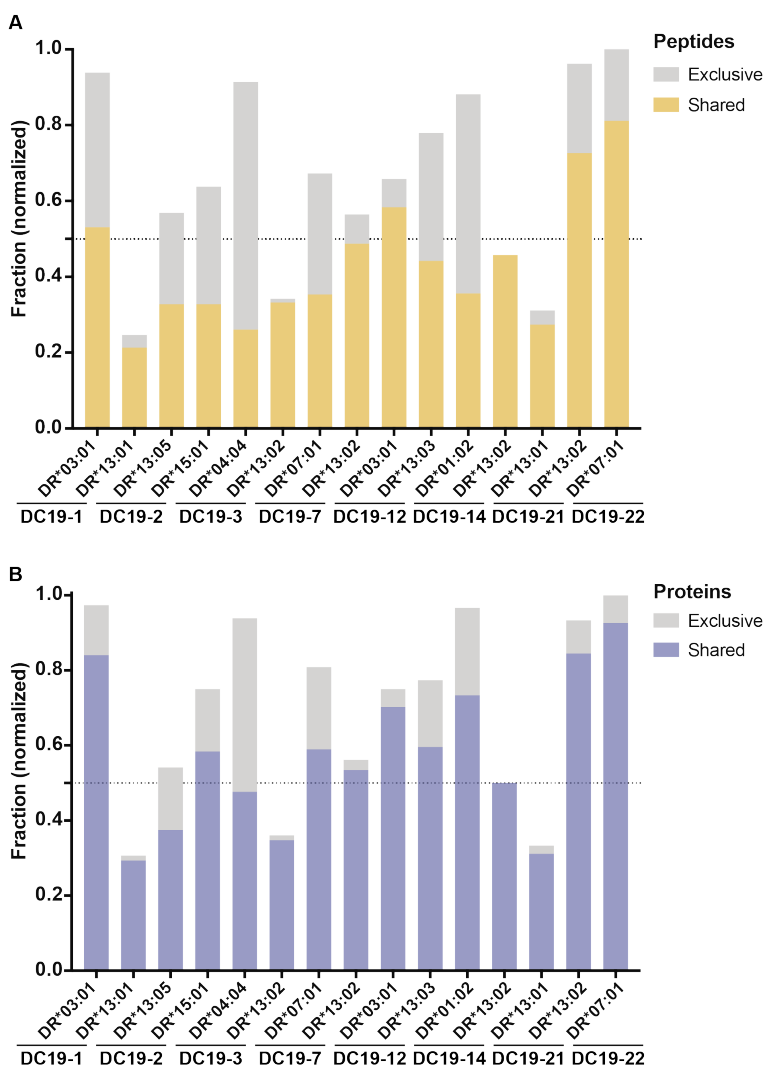


Figura 44. Fracción de péptidos y proteínas exclusivas o compartidas en cada alelo y muestra. (A) Fracción normalizada de péptidos exclusivos y compartidos en cada muestra y alelo. (B) Fracción normalizada de proteínas exclusivas y compartidas en cada muestra y alelo. Se consideran exclusivos los péptidos y proteínas que sólo se encontraban en aquella muestra, mientras que se consideran compartidos aquellos que se encuentran en otra muestra, independientemente del alelo.

Las muestras controles DC19-21 y DC19-22, presentaron fracciones muy altas tanto de péptidos como de proteínas compartidas. En el caso de la DC19-21, uno de los alelos (DR*13:02) se encontraba en otras tres muestras, pero el otro alelo (DR*13:01) solamente se encontraba en una, igual que en el caso de la muestra DC19-22

(DR*07:01, en una muestra). Dado que estas muestras no estaban pulsadas, esto podría sugerir que en ellas se encuentran proteínas comunes del ligandoma de las MoDC. Para comprobarlo, se miró el solapamiento de proteínas de estas dos muestras (de forma conjunta) con el resto de las muestras y alelos, para ver si eran exclusivas de alelo.

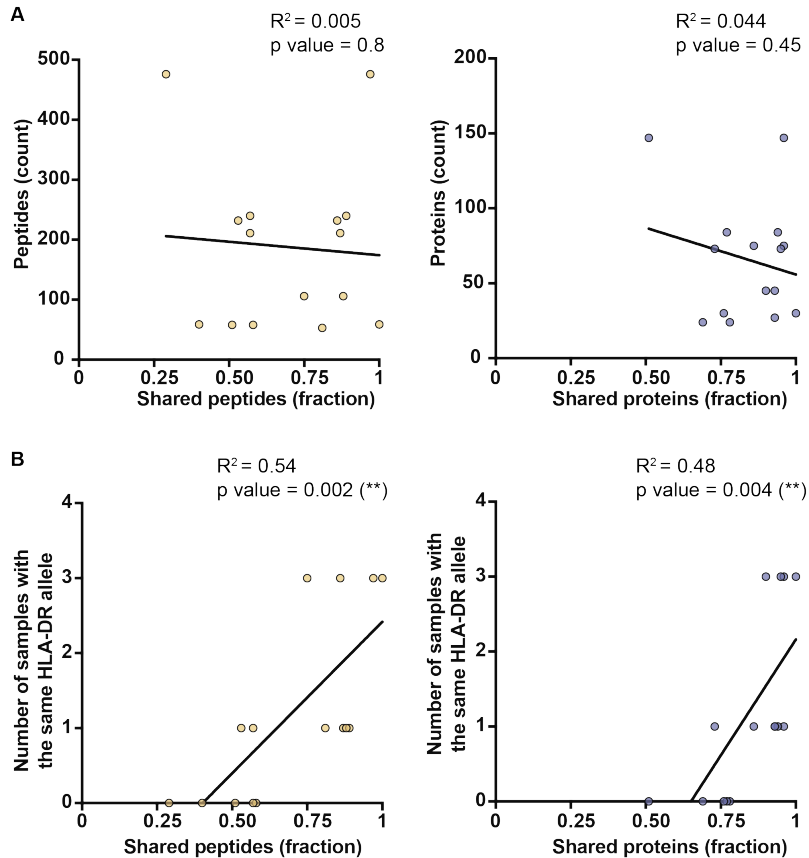


Figura 45. Correlaciones de las fracciones de proteínas y péptidos compartidas. (A) Entre la fracción compartida y el número total de péptidos y proteínas por muestra y alelo no se encontró correlación. (B) Entre la fracción compartida y el número de muestras con el mismo alelo de HLA-DR se encontró una correlación positiva, tanto para péptidos como para proteínas.

De las 64 proteínas encontradas en los controles, 7 de ellas se presentaron de forma exclusiva en estas muestras, mientras que 11 eran compartidas pero exclusivas de alelo, es decir, se encontraron en alguna otra muestra con el mismo alelo (DR*13:01, DR*13:02 o DR*07:01) (Figura 46). La mayoría de las proteínas en los controles también se encontraron en otras muestras: la mayor parte, 36 proteínas, se encontraron en alguna otra muestra con el mismo alelo, pero no de forma exclusiva, es decir también en otros alelos, y 10 proteínas se encontraron en otras muestras con

alelos distintos. Por lo tanto, en el caso de las proteínas encontradas en los controles, la mayoría no eran únicas, indicando que eran proteínas comunes que se presentan en el ligandoma natural de las MoDC.

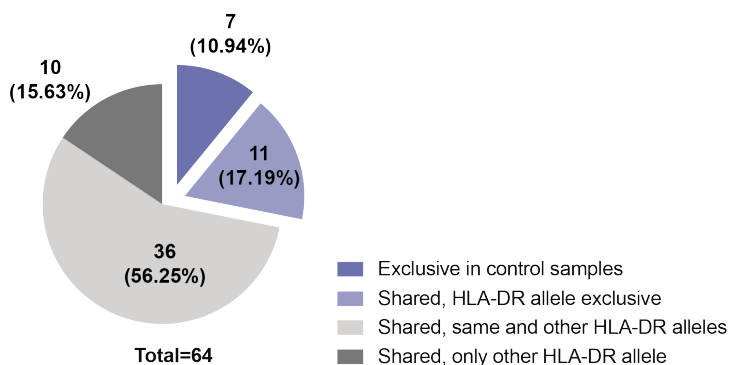


Figura 46. Número y porcentajes de proteínas en las muestras control DC19-21 y DC19-22, exclusivas y compartidas con otras muestras y alelos.

3.2.3. Solapamiento de las proteínas asociadas a HLA-DR*03:01 y HLA-DR*13:02 en MoDC

Para poder comparar si todos los alelos presentaban un solapamiento parecido o si en función del alelo el solapamiento era variable – y, teniendo en cuenta que el peptidoma compartido dependía de cuántas muestras presenten un alelo determinado – el estudio se centró en la caracterización de los alelos DR*03:01 y DR*13:02. Estos alelos fueron elegidos debido a que se encontraban en, por lo menos, dos muestras pulsadas (DR*03:01 en las muestras DC19-1 y DC19-12 y DR*13:02 en las muestras DC19-3, DC19-7, DC19-14, además de en la muestra control DC19-21). El análisis se realizó solamente con proteínas, puesto que el objetivo final era ver las variaciones de las proteínas definidas a partir del peptidoma y tras pulsar con un extracto de línea tumoral.

Se miraron las proteínas presentadas por péptidos asociados a DR*13:02 en las muestras DC19-1 y DC19-12 y las presentadas por péptidos asociados a DR*03:01 en las muestras DC19-3, DC19-7, DC19-14 y DC19-22. Entre las muestras DR*03:01, se encontraron 45 proteínas en común entre dichos alelos, mientras que en las muestras DR*13:02, se encontraron 27 proteínas compartidas (Figura 48). Es importante destacar que, el hecho de que se encontraran en común en más de una muestra no significa que fueran exclusivas de estos alelos, sino que en aquellos estudiados aparecían. A pesar de que en la comparación con muestras DR*13:02 había cuatro muestras con dicho alelo, mientras que en la comparación con muestras DR*03:01 solamente dos, en estas últimas se encontraron muchas más proteínas compartidas.

Anteriormente ya se había demostrado que el grado de solapamiento no estaba asociado a un mayor número de péptidos totales en las muestras. De hecho, en la muestra en la que se obtuvieron más péptidos fue en la muestra DC19-3 y, sin embargo, la mayoría de ellos se asociaron al otro alelo en el análisis de afinidad (DR*04:04) y los pocos asociados a DR*13:02 también se asociaron a DR*04:04. No solamente en esta muestra, sino también en la muestra DC19-7 se encontró un mayor número de proteínas compartidas entre los dos alelos (13 proteínas exclusivas encontradas en DR*07:01 y DR*13:02).

Se repitió el mismo análisis focalizado en las proteínas que se encontraban en el proteoma total de las MCF-7 y que no se encontraban en los controles, es decir, proteínas identificadas como procedentes del pulsado. Se estudió la distribución de los 167 péptidos en función de su afinidad por los alelos de las muestras analizadas (DC19-1, DC19-3, DC19-7, DC19-12 y DC19-14). De forma remarcable, el porcentaje de SB subió en los alelos DR*03:01 y DR*04:04 de las muestras DC19-1 y DC19-3 (Figura 49). Es importante destacar que el número de péptidos bajó drásticamente tras seleccionar las proteínas procedentes del extracto, pero no de forma proporcional, i. e., en las muestras DC19-1, DC19-7 y DC19-12 se habían identificado, de base, un número parecido de péptidos, sin embargo, tras seleccionar los procedentes del proteoma de la línea MCF-7, en los alelos DR*03:01 y DR*04:04 de las muestras DC19-1 y DC19-3 se obtuvieron muchos más péptidos en comparación con el resto.

Con el fin de comprobar si aquellas proteínas más abundantes en el proteoma de las MCF-7 también se encontraban en mayor número en las muestras pulsadas, se calcularon las asociaciones entre el número de péptidos y el número de PSM, así como en cuántas muestras distintas se encontraron (Figura 47). No se encontró en ninguno de los dos casos, indicando que, en general, aquellas proteínas más abundantes en el proteoma del pulsado no eran las más presentadas. Destacablemente, la clusterina no fue encontrada abundantemente en el extracto del pulsado y, sin embargo, fue la proteína identificada con más péptidos y PSMs en las muestras pulsadas (y solamente en una muestra, Tabla suplementaria 5). Otras proteínas muy abundantes en el proteoma no se encontraron más representadas (e. g., plectina, ácido graso sintasa, cadena pesada 1 de clatrina o anexina A2 o la actina citoplasmática 1), aunque no se puede descartar que, dada su abundancia, fueran contaminantes, especialmente aquellas que se encuentran en varias muestras (e.g., plectina, Figura 47C). En estudios posteriores habría que analizar estas proteínas con más detalle. Sin embargo, la sobrerrepresentación de algunas proteínas como la clusterina sugiere que ciertas proteínas pueden quedar sobrerrepresentadas por ciertos alelos (en este caso DR*04:04).

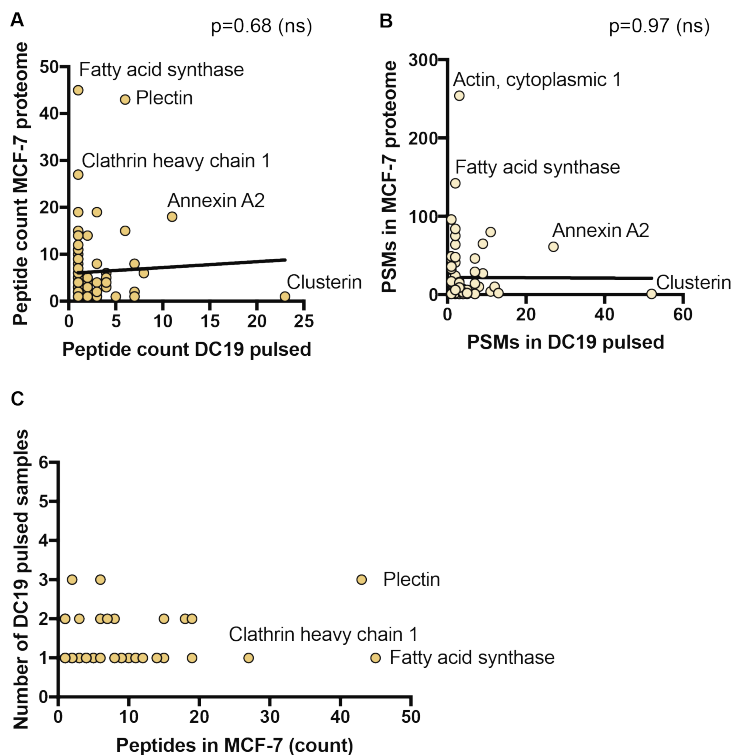


Figura 47. Relación entre las proteínas abundantes en el proteoma de las MCF-7 y su presencia en los ligandomas. No se encontró asociación entre el número de péptidos (A) y el número de PSMs (B) en el proteoma de las células MCF-7 respecto a los encontrados en las muestras pulsadas. Ciertas proteínas estaban más o menos representadas independientemente de su proporción en el proteoma total. (C) Número de muestras en las cuales aparecen ciertas proteínas en relación con la abundancia original en el proteoma. Aquellas que eran altamente abundantes en el proteoma de las MCF-7 y se encuentran o bien en alta abundancia en ciertas muestras o bien en varias muestras podrían ser posibles contaminantes y deberían ser analizados de forma individual.

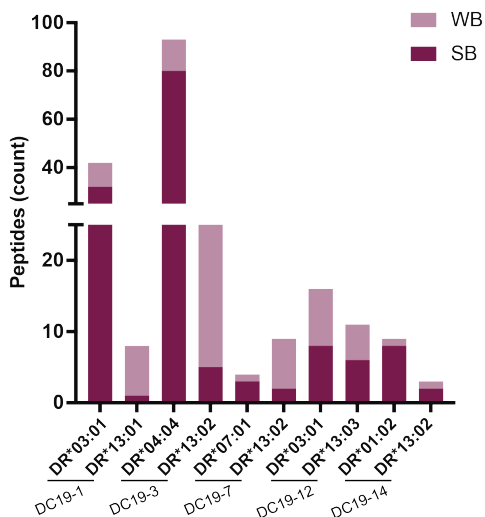


Figura 49. Número de péptidos con afinidad para cada uno de sus alelos. Los péptidos se muestran en función de si de la afinidad por el alelo era fuerte (SB) o débil (WB). Las asignaciones de afinidad se realizaron mediante la predicción obtenida por el NetMHCIIpan.

Seguidamente, se estudió el perfil de solapamiento de las proteínas procedentes del proteoma de las células MCF-7. Se encontraron 10 proteínas presentadas por péptidos asociados al alelo DR*03:01 en común en las muestras DC19-1 y DC19-12 (Figura 50A). Por el contrario, solamente se observaron dos proteínas presentadas por péptidos asociados al alelo DR*13:02 en por lo menos dos muestras (Figura 50B). Es decir, el filtrado redujo el número de péptidos y proteínas, pero los perfiles seguían siendo parecidos.

En resumen, cuando se realizó un estudio global, sin considerar el origen de las proteínas analizadas, se observó que independientemente del número de péptidos, ciertos alelos tendían a presentar las mismas proteínas, mientras que otros alelos prácticamente no compartían el proteoma presentado. Cuando el análisis se redujo a solamente aquellas que podían identificarse como procedentes del extracto de la línea MCF-7, se observó que algunas muestras presentaban muchas más proteínas de este extracto que otras, especialmente presentadas por ciertos alelos. El comportamiento general entre los dos alelos estudiados se mantuvo: el alelo DR*03:01, a pesar de que se expresaba en solamente dos muestras, tendía a presentar las mismas proteínas, mientras que en las tres muestras que expresaban el alelo DR*13:02, prácticamente no se observó solapamiento.

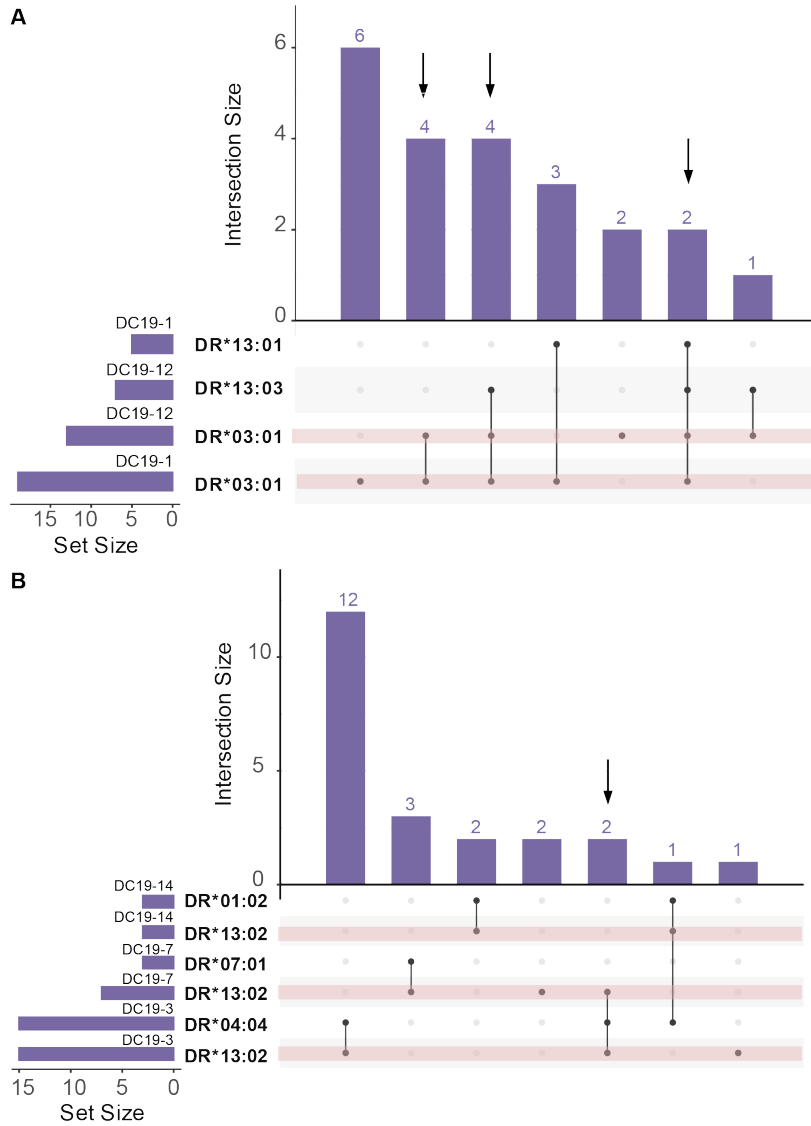


Figura 50. Solapamiento de las proteínas exclusivas del proteoma total de las MCF-7 encontradas en las muestras con los alelos DR*03:01 y DR*13:02. (A) En las muestras DC19-1 y DC19-12, se encontraron 10 proteínas compartidas presentadas por el alelo DR*03:01. (B) En las muestras DC19-3, DC19-7 y DC19-14 se encontraron solamente dos proteínas compartidas presentadas por el alelo DR*13:02. A pesar de que el filtrado por proteínas exclusivas del proteoma de la línea MCF-7 decrementó el número de proteínas, los perfiles fueron muy parecidos a cuando se compararon las proteínas totales.

3.2.4. Efecto de la combinatoria alélica en la presentación de proteínas de un extracto de la línea celular tumoral MCF-7

Los resultados obtenidos anteriormente, mostraron un grado de solapamiento muy distinto entre el mismo alelo en diferentes muestras. Debido a que se identificaron proteínas distintas presentadas por el alelo DR*13:02 en las tres muestras analizadas, se podría hipotetizar que el alelo acompañante de cada muestra podría tener un efecto parcialmente compensatorio para cubrir el repertorio no presentado. Por otro lado, si DR*03:01 tendía a presentar las mismas proteínas, podría ser que en el otro alelo de cada muestra se produjera un efecto similar al observado en DR*13:02. Por ello, se realizó un estudio más detallado en el cual se miraron qué proteínas del proteoma de la línea MCF-7 se presentaban por las muestras en el conjunto de sus dos alelos, así como cuántos péptidos se encontraban asociados a cada uno de ellos.

Entre las 10 proteínas compartidas por DC19-1 y DC19-2 y presentadas por el alelo DR*03:01, cuatro de ellas se identificaron exclusivamente en dicho alelo (). La proteína con más péptidos identificados en la muestra DC19-1 fue la vinculina y la glucosa-6-fosfato isomerasa, ambas con siete péptidos asociados a DR*03:01 y dos péptidos asociados al alelo DR*13:01 acompañante. Solamente la vinculina se encontró en la muestra DC19-2, en la cual la proteína con más péptidos identificados fue la *stress-induced phosphoprotein 1*, con tres péptidos asociados al alelo DR*03:01 y ninguno en el otro alelo DR*13:03. Mientras que en la muestra DC19-1 la mayoría de los péptidos y proteínas estaban asociados al alelo DR*03:01 y solamente unos pocos – y mayoritariamente coincidentes – en el alelo DR*13:01, en la muestra DC19-2 la cantidad de péptidos y proteínas encontrados fue más parecida entre alelos y se observó un solapamiento más equilibrado.

No se encontró ninguna proteína exclusiva en las muestras expresando el alelo DR*13:02. En la muestra DC19-3, la proteína con más péptidos identificados fue la clusterina, con 23 péptidos asociados al alelo DR*04:04 y ninguno al alelo DR*13:02. En esta muestra se encontró, en general, un alto número de péptidos y proteínas en comparación con todo el resto de las muestras estudiadas, pero también fue la muestra de la que se obtuvieron más péptidos. Sin embargo, casi en su totalidad, éstos estaban asociados al alelo DR*04:04. De forma parecida a lo observado en la muestra DC19-1, el alelo DR*13:02 estaba desequilibrado y los péptidos asociados a éste también lo están al alelo DR*04:04. En las muestras DC19-7 y DC19-14, se encontró un bajo número tanto de péptidos como de proteínas, siendo la plectina y la *Ras-related protein Rab-5C* las más abundantes, aunque con tan solo tres péptidos asociados a los alelos DR*13:02 y DR*01:02, respectivamente. No se encontraron más péptidos de estas proteínas en ninguna otra muestra. Es importante destacar que, si bien en la muestra DC19-14 se obtuvo un bajo número de péptidos y quizás no fueran representativos del peptidoma, la muestra DC19-7 tenía un tamaño asimilable

al de las muestras DC19-1 y DC19-12. Sin embargo, en esta muestra prácticamente no se encontraron péptidos procedentes del proteoma de las MCF-7.

Para tener una visión global de la similitud de las muestras y sus alelos, se realizó un *clustering* jerárquico usando tanto el global de las proteínas encontradas en todas las muestras como solamente con aquellas identificadas como parte del pulsado. En los dos análisis se encontraron más cercanos los dos alelos de una misma muestra, a excepción de la DC19-7 y la DC19-3 en el análisis global. Los alelos DR*07:01 y DR*13:02 de la DC19-7 se agruparon, respectivamente con los mismos alelos de los controles DC19-22 y DC19-21. Esto significaría que la mayoría de las proteínas presentadas por esta muestra procedían del ligandoma natural y no del pulsado, tal y como se había observado anteriormente. Por otro lado, en el análisis del proteoma pulsado también se observó una asociación de alelos distintos de una misma muestra. Sin embargo, los alelos DR*03:01 de las muestras DC19-1 y DC19-12, en este caso, estaban jerárquicamente más cercanos. Tal y como se había observado anteriormente, la muestra más alejada fue la DC19-3 por el alelo DR*04:04 que presentó un elevado número de proteínas procedentes del pulsado.

Estos datos, indicarían que ciertos alelos, entre los estudiados, tienen tendencia a presentar unas proteínas concretas, como en el caso de DR*03:01 o DR*04:04 y además su presencia puede influenciar el peptidoma presentado por el alelo acompañante.

Capítulo III. Resultados

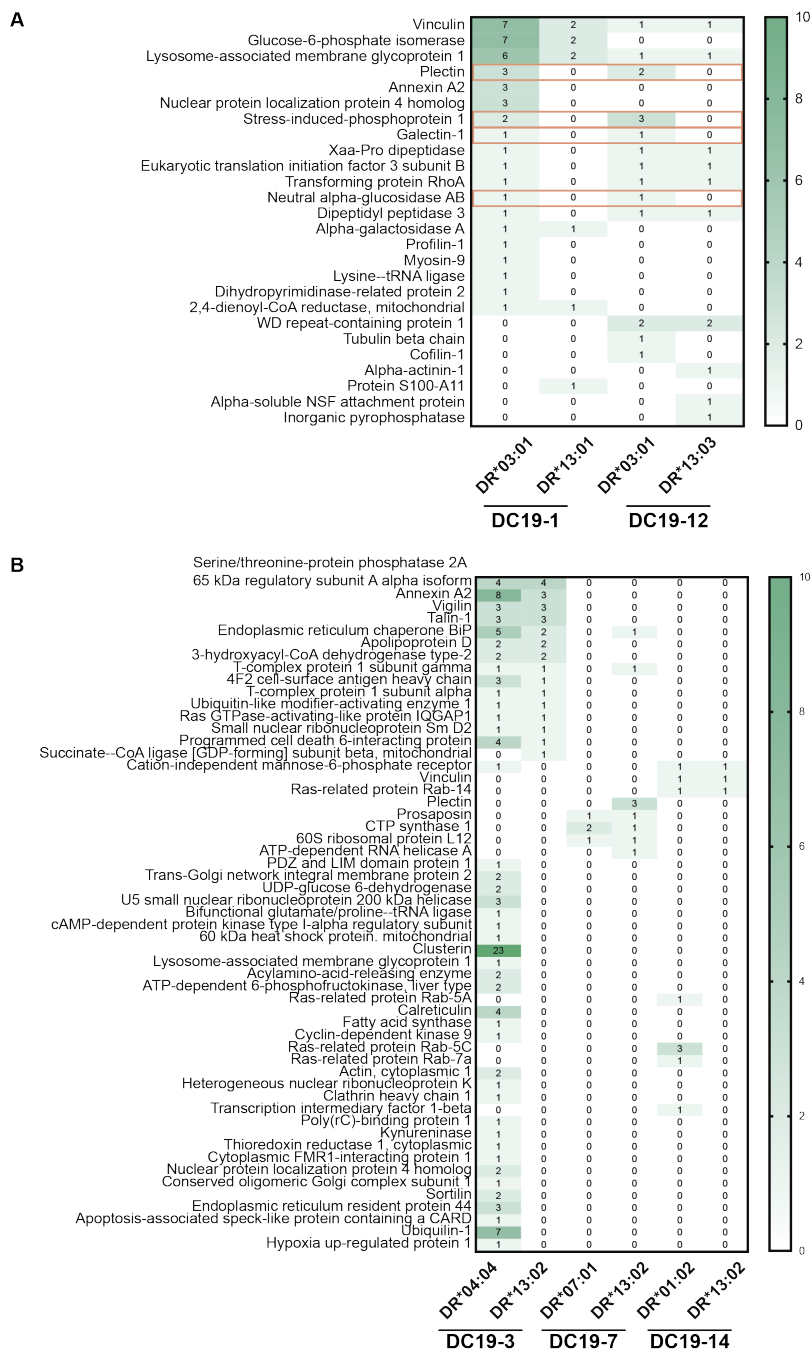


Figura 51. Proteínas procedentes del proteoma del extracto de la línea MCF-7 y número de péptidos identificados asociados a los dos alelos de cada muestra. Los resultados se dividen entre proteínas identificadas en las muestras pulsadas portadoras del alelo DR*03:01 (A) y del alelo DR*13:02 (B).

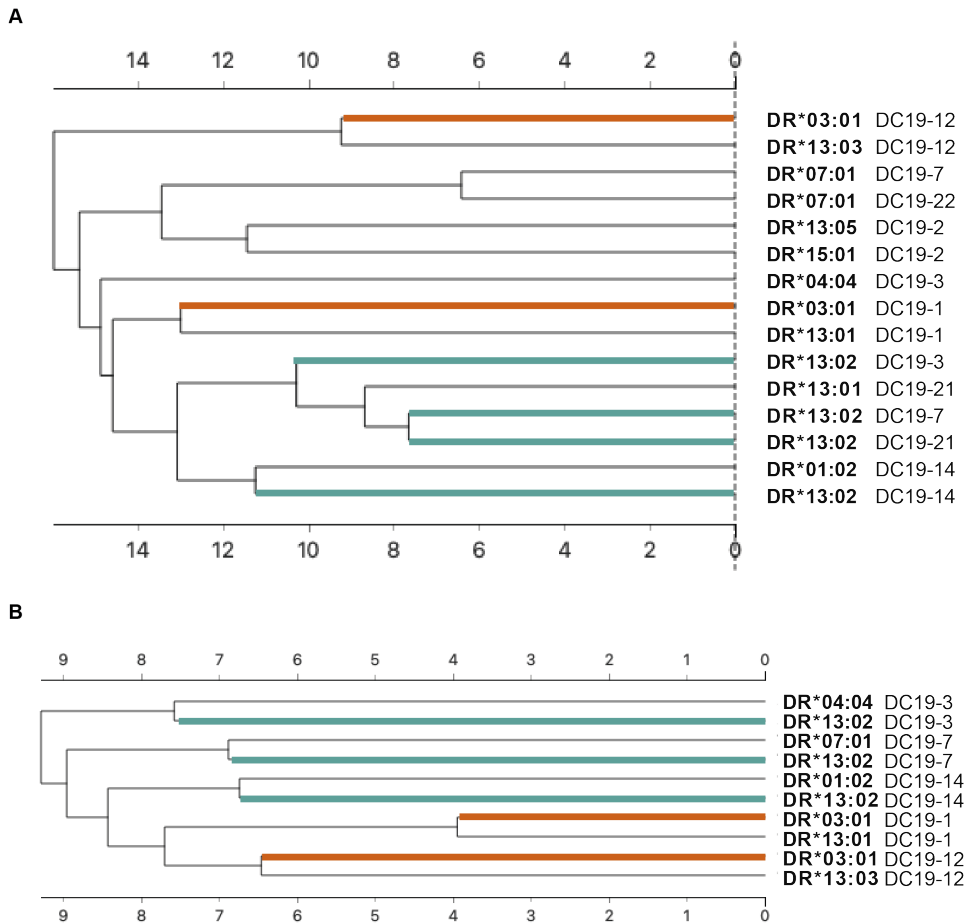


Figura 52. Agrupación jerárquica de las muestras en base a su similitud por el patrón de proteínas presentadas. (A) Agrupación jerárquica en las muestras pulsadas y control, teniendo en cuenta todas las proteínas identificadas. (B) Agrupación jerárquica en las muestras pulsadas portadoras de los alelos DR*03:01 o DR*13:02, teniendo en cuenta solamente las proteínas identificadas como procedentes del pulsado con la línea MCF-7. Se muestran en ambos casos patrones similares, en los que cada alelo presenta un proteoma parecido al del otro alelo. En el análisis global (A) la similitud del patrón de los alelos de la muestra DC19-7 fue menor y estos, a su vez, eran más similares a los mismos alelos en las muestras control (DC19-21 y DC19-22). En el análisis concreto del proteoma de las MCF-7 (B) las muestras que expresaban el alelo DR*03:01 se asemejaban más que las muestras portadoras del alelo DR*13:02.

3.3. Discusión

En este capítulo se ha realizado un estudio preliminar en el cual se ha estudiado cómo se presentan las proteínas de un extracto en distintos alelos de HLA-DR. Es importante remarcar que, el objetivo de esta parte de la tesis se ha alcanzado solo parcialmente, puesto que se pretendía llegar a estudiar el peptidoma presentado pulsando los extractos tumorales tras hacer este estudio preliminar usando un extracto de la línea tumoral de CM MCF-7. Sin embargo, esta primera aproximación nos ha permitido sacar varias conclusiones que deberán considerarse cuando se obtengan los resultados de las MoDC pulsadas con extractos de tumores. Brevemente, usando la línea celular MCF-7, se pulsaron seis muestras de MoDC generadas a partir de PBMC de seis donantes sanos y se generaron otras dos muestras control sin pulsar. En total, se abarcaron ocho alelos distintos de HLA-DR y cabe destacar que no se eligieron los haplotipos previamente. El proteoma total del extracto también se analizó para su comparación con el peptidoma presentado por las MoDC.

El tamaño de los péptidos se correspondió con el tamaño clásico de los péptidos presentados por HLA-DR. Se observaron ciertas diferencias respecto a la localización celular de las proteínas presentes en las muestras pulsadas y las muestras sin pulsar. La mayoría de las proteínas identificadas en las muestras control eran procedentes de la membrana, lo cual es una característica común de los ligandomas naturales de clase II. En las muestras pulsadas se observó un mayor porcentaje de péptidos procedentes de proteínas localizadas en el citosol, así como un incremento en el porcentaje de proteínas secretadas o de matriz extracelular, nucleares y de mitocondrias. En cierto modo, esto podría indicar que las proteínas del extracto habrían desplazado parcialmente el peptidoma presentado. Sin embargo, hay que tener en cuenta que es una comparación de ocho muestras *versus* dos muestras control.

Se observó un bajo número de proteínas presentes en el extracto en las muestras pulsadas, aunque en porcentaje, respecto al de las muestras control, fue mucho mayor. En el proteoma humano se encuentran 10 millones de secuencias 9-mer, tamaño de los péptidos presentados por HLA-I y del *core* de los péptidos presentados por HLA-II. Sin embargo, se estima que cada molécula de HLA-I puede presentar entre 1000 y 10000 péptidos, mientras que las moléculas de HLA-II (menos bien establecido que en clase I) se calcula que pueden presentar más de 2000 péptidos^{361,362}. Esto indica que, a pesar de la promiscuidad de las moléculas de HLA, el número de péptidos que pueden presentarse viene limitada por los motivos de anclaje. Por ello, no es insólito encontrar un bajo porcentaje de proteínas presentadas por las células pulsadas respecto a las encontradas en el proteoma del extracto.

En el análisis de predicción de afinidad para los distintos alelos de las muestras estudiadas se determinó qué proporción de péptidos de cada muestra se podría asociar a uno u otro alelo, o a ambos. Se observó una descompensación en algunas muestras

en las cuales se asociaron muchos más péptidos a un alelo que a otro. Además, en estas muestras la mayoría de los péptidos asociados al alelo “desfavorecido” podían también asociarse al otro alelo. Se descartó que esto fuera debido a un bajo número de péptidos en esas muestras. El anticuerpo utilizado para las inmunoprecipitaciones reconoce un epítipo específico de HLA-DR común para todos los alelos. A pesar de no poder confirmar el origen de este desequilibrio, en un estudio anterior en el cual se estudió el ligandoma natural de muestras de timo y bazo con distintos alelos de HLA-DR, usando el mismo anticuerpo, también se observó este efecto³⁶³.

Como es lógico, muchos de los péptidos no se presentaron en varias muestras debido a la restricción alélica, pero, sorprendentemente, se detectó igualmente una alta fracción de proteínas exclusivas en cada muestra y alelo. Se corroboró de forma estadística y se encontró una correlación significativa entre el número de muestras con un mismo HLA con el número de péptidos y proteínas compartidas. Este hecho iría en consonancia con la restricción alélica definitoria del peptidoma presentado, dado que aquellas muestras que eran únicas en cuanto a la expresión de un alelo (especialmente DR*04:04 y DR*01:02) presentaban una fracción mucho mayor de proteínas exclusivas, es decir, estas proteínas no se presentaron por ninguno de los otros siete alelos con los que se comparó. Se descartó que un mayor porcentaje de proteínas compartidas se diera en aquellas muestras con un mayor número de péptidos identificados. Sin embargo, el bajo número de péptidos asociados a ciertos alelos también podría influir al bajo solapamiento.

Debido a esta restricción alélica y la imposibilidad de comparar adecuadamente distintos alelos, se exploraron solamente las muestras que presentaban los alelos DR*03:01 (en dos muestras) y DR*13:02 (en tres muestras pulsadas y una muestra control). La coincidencia de proteínas asociadas al alelo DR*03:01 en las dos muestras fue casi del doble de la encontrada en DR*13:02 en las cuatro muestras. De hecho, la mayoría de las proteínas identificadas en los alelos DR*13:02 eran compartidas con el otro alelo de la misma muestra. Se confirmó que este efecto se mantenía cuando se estudiaban las proteínas identificadas como procedentes del pulsado. En este análisis más acotado se observó que había incrementado el porcentaje de péptidos atribuidos como SB en ciertos alelos, concretamente en DR*03:01 de la muestra DC19-1 y DR*04:04 de la muestra DC19-3. En los alelos acompañantes se observó un patrón invertido, es decir, con un porcentaje mayor de WB. Si se hubiesen considerado solamente los SB, la descompensación entre alelos en ciertas muestras hubiese sido aún mayor a la observada. Resulta curioso que esto sucediera en las cuatro muestras portadoras de este alelo. En cualquier caso, en la continuación del estudio también debería complementarse la predicción de la afinidad para una mejor asociación.

Ciertas proteínas muy abundantes en el extracto pulsado podrían aparecer en las muestras pulsadas como contaminantes. Se estudió qué asociación había entre su presencia en el extracto y en las muestras y se determinó que las proteínas más

abundantes no eran aquellas más identificadas. Sin embargo, algunas proteínas con alta presencia en el extracto deberían considerarse con cautela. Por otro lado, la clusterina fue la proteína identificada más veces en número de péptidos y PSM a pesar de su baja abundancia en el proteoma del pulsado. Además, solamente se encontró en una muestra y con péptidos asociados al alelo DR*04:04, lo cual reafirmaría la hipótesis de que cada alelo selecciona ciertas proteínas de forma relativamente independiente a su abundancia.

Es difícil contrastar estos datos con la literatura por varios motivos. En primer lugar, los motivos de unión de las moléculas de HLA-II están menos bien definidos, en contraste con los de HLA-I. Por ello, la mayoría de los estudios se basan en la propia descripción de los motivos de unión de distintos alelos de HLA-DR, mayoritariamente en líneas celulares homocigotas. Por el contrario, el ligandoma natural de las MoDC está mucho menos descrito y la heterocigosis de estas muestras entorpece todavía más su comparación. No obstante, algunas de las conclusiones descritas en los ligandomas naturales podrían ayudar al análisis de MoDC pulsadas. En clase I se ha descrito que las proteínas más grandes están más presentadas, ya que una mayor longitud de secuencia confiere más probabilidad a encontrar el motivo de unión requerido³⁶². Por otro lado, tanto en clase I como en clase II se ha descrito que las proteínas más abundantes son generalmente más presentadas^{361,362,364}, lo cual es lógico debido a que una mayor cantidad lleva a un mayor número de proteínas degradadas. A pesar de esto, algunas proteínas abundantes no suelen encontrarse en el peptidoma y se ha reportado una asociación entre la vida media de una proteína con su presentación, i. e., las proteínas con una vida media más larga se renuevan menos, reduciendo la abundancia de proteína que puede degradarse³⁶². Este último factor no debería esperarse en la presentación de proteínas de un pulsado, ya que dejan de ser proteínas que se renuevan, pero podría ayudar a discernir entre las proteínas presentadas. A pesar de que la abundancia en el extracto sí ha sido estudiada en nuestras muestras, el resto de los factores deberían considerarse en posteriores análisis.

Sería razonable pensar que, si ciertos alelos restringen las proteínas que presentan, el alelo acompañante debería compensar la ausencia del resto, e incluso más si se considerara el haplotipo. Sin embargo, cuando se estudió qué proteínas presentaban las respectivas parejas alélicas se observó un comportamiento distinto en cada combinación. En la muestra DC19-1, el alelo DR*03:01 presentó la mayor parte del pulsado y DR*13:01 no contribuyó a complementarlo. No obstante, en la muestra DC19-12 no se observó este efecto y ambos alelos (DR*03:01 y DR*13:03) presentaron un número parecido de péptidos y proteínas y con un solapamiento más equilibrado. En parte, esto podría explicarse por unos motivos de anclaje más parecidos, ante los cuales se produzca una competencia en la unión de estos. De forma similar a la muestra DC19-1, se observó una descompensación entre los péptidos

Capítulo III. Discusión

asociados a los alelos DR*04:04 y DR*13:02 en la muestra DC19-3 (se identificaron muchas más proteínas y péptidos en el primero que en el segundo). Hay que tener en cuenta que no se han estudiado dichas combinaciones por duplicado. Sin embargo, las muestras DC19-7 y DC19-14 no mostraron esta descompensación. De hecho, en estas dos muestras se identificaron muy pocas proteínas procedentes del pulsado, lo cual, en el caso de la muestra DC19-14, podría atribuirse a un bajo número de péptidos totales obtenidos, pero no en la DC19-7. En este último caso, se obtuvo un número de péptidos asociados a cada alelo similar pero prácticamente no se encontraron proteínas del extracto. Es plausible pensar que de un número limitado de proteínas del extracto del pulsado (1292) distintos alelos presenten una cantidad muy desigual de péptidos.

Tras agrupar las muestras por su similitud teniendo en cuenta las proteínas identificadas se observó que, en general, todos los alelos se parecían más a su pareja alélica que al mismo alelo de otra muestra en el análisis global de péptidos identificados. Esto iría en contradicción con la idea de que cada alelo presenta un rango distinto de proteínas, aunque probablemente no sea debido a una similitud real. Como ya se ha mencionado, en varias muestras se asignó un porcentaje superior de péptidos a un alelo respecto al acompañante. Además, la mayoría de ellos eran en realidad péptidos con alta afinidad para el alelo “dominante” y baja para el acompañante, lo cual produce un efecto de similitud irreal. Como excepción, las muestras DC19-7 y DC19-3 mostraron más divergencia entre sus dos alelos: la primera porque se acercó mucho más a las muestras control portadoras de sus mismos alelos (DR*07:01 en la DC19-22 y DR*13:02 en la DC19-21) y la segunda por un alejamiento del alelo DR*04:04, que podría explicarse por una divergencia mayor a su pareja alélica. En el análisis del pulsado, sin embargo, los alelos DR*03:01 se parecían más que en el análisis global.

Estudios anteriores indican que los alelos determinan en gran parte las proteínas que presentan y en cierto modo esto ha sido observado también en nuestras muestras. Más allá de la abundancia, el tamaño de la proteína y la vida media, en un estudio reciente (Karnaukhov et al. 2021 PREPRINT³⁶⁵) se realizó una demostración *in silico* de que distintos alelos de clase I presentan diferencialmente proteínas de distintas categorías funcionales. Esto es debido a las preferencias de anclaje de cada alelo, asociados a una composición aminoacídica concreta que, a su vez, puede estar relacionada con su función proteica, e. g., ciertos alelos presentan un mayor porcentaje de proteínas asociadas a la membrana por su alta frecuencia de residuos hidrofóbicos que favorece su presentación, mientras que otros con requerimientos de lisina o arginina a menudo presentan proteínas de interacción con el ADN. Por el mismo motivo, la presentación de ciertas proteínas queda excluida en la gran mayoría de alelos, por ejemplo, cuando presentan altos porcentajes de glicina o prolina que dificultan su anclaje. En el mismo estudio se mostraron diferencias entre las categorías

funcionales de las proteínas presentadas por HLA-DR y HLA-DQ, pero no se estudiaron en profundidad las diferencias entre alelos de clase II.

Existen diferencias importantes respecto a los motivos de unión de las moléculas de clase I y clase II, i. e., los péptidos asociados a las moléculas de clase II son de tamaños variables, dado la permisividad de residuos flanqueantes en los extremos N- y C-ter del *core* de unión. Además, los motivos de anclaje que restringen la unión de péptidos de clase I están definidos principalmente por las posiciones P2 y P9, mientras que, en clase II son definidos por los bolsillos P1, P4, P6 y P9. Por ello, las proteínas que se presenten por clase I requieren de ciertos aminoácidos concretos muy determinantes, pero las de clase II (y a pesar de que se permitan distintas longitudes peptídicas) requieren de un mayor número de residuos concretos en unas posiciones concretas. Además, se ha descrito que incluso los residuos flanqueantes están restringidos en ciertos alelos³⁶⁶.

La sobrerrepresentación (o subrepresentación) de ciertas proteínas se ha descrito anteriormente en la mayoría de los estudios del repertorio presentado por HLA-DR^{310,311,366,367}. En un amplio estudio de 14000 péptidos realizado por Mommen et al.³⁶⁴ se estimó que las 100 proteínas más comunes ocupan el 80 % de las moléculas HLA-DR expresadas y que el 84 % de los péptidos formaban parte de *nested sets*. La presencia de *nested sets*, por un lado, limita la cantidad de proteínas que se presentan y, por otro, podría tener relación con distintas necesidades de dosis de antígeno entre LT CD4+ y CD8+³⁶⁸. En conjunto, la representación del proteoma presentado a través de moléculas de HLA-DR es más limitada y, en parte, podría deberse a una mayor restricción generada por el mayor número de residuos de anclaje necesarios. Por ello, en el caso de clase II la presentación de ciertas proteínas podría no estar tan relacionada con su categoría funcional, pero sí podría ser que ciertos alelos tendieran a presentar unas proteínas más que otras.

A pesar de la baja representación de ciertas proteínas, la hipótesis de la ventaja heterocigota, inicialmente propuesta por Doherty y Zinkernagel³⁶⁹, deduce que los individuos en heterocigosis en los loci del HLA presentan una ventaja evolutiva dado que pueden presentar una mayor variedad de péptidos derivados de patógenos. También se ha propuesto que, incluso en heterocigosis, las combinaciones de alelos más divergentes confieran una ventaja en la inmunocompetencia³⁷⁰. Sin embargo, si ciertos alelos tienden a presentar un tipo concreto de proteínas, podría suceder que ciertas combinaciones alélicas pudieran ser favorecedoras o desfavorecedoras en ciertos contextos. La ausencia de representación de ciertas proteínas en nuestras muestras debería ser compensada por el haplotipo. Se ha reportado en predicciones *in silico* que la presentación por parte de haplotipos comunes difiere de la que se presentaría por alelos combinados al azar³⁶⁵. Esto no ha sido estudiado ampliamente, pero sin duda debe ser considerado.

Capítulo III. Discusión

La restricción alélica y el conjunto de péptidos e incluso de proteínas presentados, tiene un claro efecto sobre el repertorio de TCR. Su moldeamiento en el timo tiene una consecuencia directa en la inmunocompetencia de los individuos, aunque la configuración del repertorio de LT CD8+ y CD4+ pueda ser distinta debido a las diferencias intrínsecas a la presentación por moléculas de HLA de clase I y de clase II. Por este mismo motivo, conocer los ligandomas de distintos alelos, así como el de los haplotipos completos, mejoraría la comprensión de los análisis del repertorio de TCR en distintos contextos.

Capítulo IV. Estudio de linfocitos B Epstein-Barr Virus+ infiltrantes de tumor en la respuesta inmunológica en cáncer de mama: informe de un caso⁷

⁷ Artículo publicado. Aran A, Peg V, Rabanal RM, Bernadó C, Zamora E, Molina E, Arribas YA, Arribas J, Pérez J, Roura-Mir C, Carrascal M, Cortés J, Martí M. Epstein-Barr Virus+ B Cells in Breast Cancer Immune Response: A Case Report. *Front Immunol.* 2021 Nov 16;12:761798. doi: 10.3389/fimmu.2021.761798. PMID: 34868006; PMCID: PMC8637110.

Todos los datos suplementarios de este capítulo se encuentran online en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.761798/full#supplementary-material>.

4.1. Antecedentes

La presencia de APC – tanto de DC como de LB – en la composición del infiltrado tumoral es uno de los factores que pueden influenciar a la respuesta anti-tumoral. Las DC pueden migrar del sitio del tumor a los linfonodos proximales y activar LT antígeno-específicos, pero la presencia de APC en el sitio del tumor es necesaria para el mantenimiento tanto de LT citotóxicos como de Th. En los últimos años, el rol de los LB ha ganado interés, ya que su presencia en altos niveles se ha asociado a un buen pronóstico en el cáncer de mama³⁷¹, así como en cáncer colorrectal³⁷², cáncer ovárico³⁷³, carcinoma hepatocelular³⁷⁴, sarcoma de partes blandas³⁷⁵ y cáncer de pulmón³⁷⁶. Sin embargo, el rol de los LB como APC activas en el sitio del tumor no está bien establecido.

Por otro lado, y dado que los LB son la diana celular principal del virus de Epstein-Barr (EBV)³⁷⁷ – uno de los virus humanos más frecuentes la infección del cual se adquiere normalmente de forma asintomática durante la infancia – no es de extrañar que entre los TIL puedan encontrarse LB infectados por EBV (EBV+ LB)³⁷⁸. Éste fue el primer virus oncogénico humano descubierto, tras ser aislado de un paciente con linfoma de Burkitt³⁷⁷ y, actualmente, se ha establecido la relación entre la infección de EBV con varios linfomas, i. e., linfoma de Burkitt^{377,379}, linfoma de Hodgkin^{380,381} y trastorno linfoproliferativo postrasplante^{382,383}. En los últimos años, la influencia de los virus endógenos en el desarrollo de carcinomas ha ganado interés³⁸⁴. Sin embargo, la mayoría de estos estudios están focalizados en el papel de estos virus en la transformación maligna de células epiteliales, pero también debería considerarse la influencia de las células inmunitarias infectadas por virus en la respuesta anti-tumoral. Aunque las células epiteliales pueden ser infectadas por el EBV, su reservorio natural en el cuerpo son los LB³⁸⁵. Además, es más probable que se produzca un efecto inmunomodulador cuando el virus infecta a los LB que a las células epiteliales, ya que estas últimas no expresan moléculas de HLA de clase II y pueden *downregular* la expresión de moléculas de HLA de clase I³⁸⁶, evitando el reconocimiento.

Debido a la capacidad del EBV a persistir en estado latente, puede mantenerse durante toda la vida en sus huéspedes. Es sabido que el EBV puede aprovechar estados de inmunosupresión³⁸⁷, como demuestra el aumento de la incidencia de linfomas en pacientes infectados por VIH o con órganos trasplantados³⁸⁸. Esto está respaldado por un estudio realizado por el grupo de Mazar que reportó que un 32 % de los xenoinjertos derivados de pacientes (PDX, del inglés *patient-derived xenograft*) generados con material tumoral progresan a neoplasias linfocíticas EBV+³⁷⁸, como también se ha observado en otros estudios^{389,390}. Este proceso confirma que los ratones NOD (del inglés, *non obese diabetic*) SCID (del inglés, *severe combined immunodeficiency*) gamma, usados para la generación de PDX, son más susceptibles a neoplasias malignas

asociadas al EBV debido a la falta de respuesta inmunitaria, pero también pone de relevo la presencia de células EBV+ en el material tumoral.

Los EBV+ LB en estado infeccioso del ciclo viral inducen una fuerte respuesta T específica³⁹¹. Sin embargo, bajo la influencia del microambiente tumoral y/o de tratamientos inmunomoduladores, el comportamiento, respuesta y repertorio de los TIL podrían verse afectados, no solamente de los linfocitos tumor-específicos sino también de otras células como LT EBV-específicos. Esto daría una oportunidad al EBV de sobrevivir, pero también podría tener consecuencias a largo plazo, afectando al sistema inmunitario. La presencia de LT EBV-específicos entre el infiltrado tumoral ha sido descrito y, en dos estudios recientes, se ha sugerido su involucración en el desarrollo de procesos inflamatorios severos (miocarditis³⁹² y encefalitis³⁵³) en pacientes con melanoma después de tratamiento con ICPI.

El objetivo de este capítulo fue determinar la relación entre los LT y los EBV+ LB infiltrantes de un tumor de cáncer de mama triple negativo. Los LB generados en un PDX, que derivaron a un linfoma B asociado a un xenoinjerto (XAL, del inglés *xenograft-associated B cell lymphoma*), fueron usados como línea celular linfoblastoide (LCL) transformada por el EBV para estudiar estas interacciones. Se realizaron secuenciaciones de TCR y de BCR para estudiar la presencia de los TIL en el tumor, así como para monitorizar las expansiones de los LT. También se estudió el repertorio peptídico presentado por HLA-ABC y HLA-DR de las células XAL-LCL y se comparó con el peptidoma de varias LCL descritas en la literatura. En resumen, se realizó un estudio para determinar si los LB EBV+ *bystander*, mediante su función de APC, pueden interactuar con los T-TIL, participando en la respuesta tumoral que podría, por lo tanto, influenciar el pronóstico del cáncer.

4.2. Resultados

4.2.1. El tumor generado en un PDX derivado de un tumor de mama fue el resultado de una expansión monoclonal de B-TIL EBV+

La unidad de Anatomía Patológica del Vall d'Hebron Institute of Oncology (Barcelona, España) confirmó la presencia de un carcinoma ductal infiltrante triple negativo (grado histológico 3, sin invasión vascular, receptor de estrógeno (ER) negativo, receptor de progesterona (PR) negativo, factor epidérmico de crecimiento humano 2 (HER2, del inglés, *human epidermal growth factor 2*) negativo y Ki67 70 %) en una paciente de 44 años. Se obtuvieron dos biopsias *core* al mismo tiempo, 2 semanas después del diagnóstico y antes de la quimioterapia neoadyuvante. Una de ellas fue inoculada en un ratón NSG (NOD SCID gamma) para obtener un PDX y la otra fue usada para estudiar el infiltrado de T-TIL directamente del tejido o de los cultivos celulares (procedentes de la biopsia 562 ver página 53).

La IHC realizada por el servicio de Anatomía Patológica reveló la presencia de T-TIL CD3+ (Figura 53B) y B-TIL CD20+ (Figura 53C). En cuanto a los subtipos celulares, se observaron tanto T-TIL CD4+ (Figura 53D) como CD8+ (Figura 53E), aunque en mayor presencia los primeros. Además, se observó una distribución similar de los B-TIL y los T-TIL CD4+, sugiriendo que estas células podían estar interactuando en el sitio del tumor.

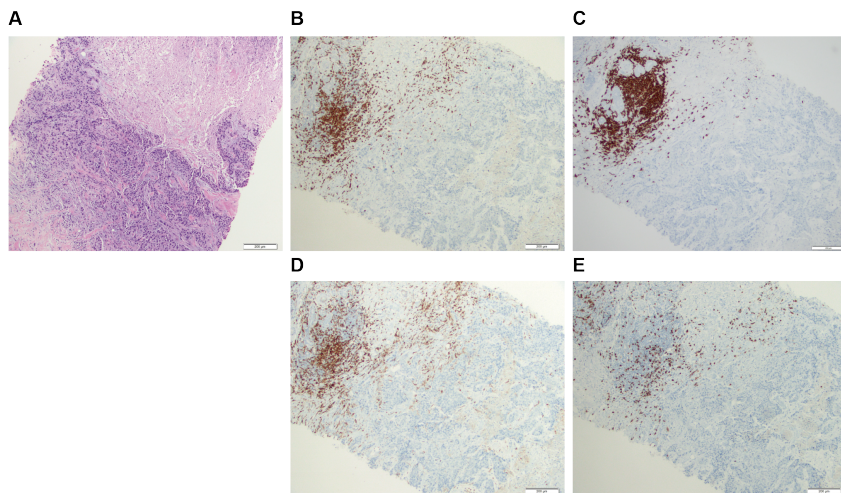


Figura 53. Tinción con hematoxilina y eosina (HE) e inmunohistoquímica (IHC) de la biopsia 562 realizada tras el diagnóstico. (A) Sección histológica del carcinoma de mama (HE x 200). (B) La tinción de CD3 por IHC destaca numerosos LT CD3+ en el frente infiltrante de la neoplasia (x 200). (C) La tinción de CD20 por IHC revela una distribución similar de LB CD20+ con los LT CD3+ (x 200). (D) La tinción de CD4 por IHC muestra que la mayoría de LT eran CD4+ (x 200). (E) La tinción de CD8+ revela un menor número de LT CD8+, aunque más cerca del tumor en el frente infiltrante (x 200).

Capítulo IV. Resultados

El tumor procedente del PDX se generó tras tres pases en ratón y, tras ser digerido y puesto en cultivo, se observó que las células no mostraban características de célula tumoral epitelial sino de LB. Se confirmó el origen linfocítico por IHC, dado que el tumor estaba formado por células CD20+ y, además, algunas de ellas presentaban núcleos bilobulados, tales como los de las células Reed-Sternberg asociadas al linfoma de Hodgkin³⁸⁰ (Figura 54). Se realizó un análisis fenotípico mediante citometría de flujo de las células en cultivo del tejido digerido que reveló un patrón molecular semejable al de los LB activados de centro germinal, i. e., CD19+, CD20+, CD21- y CD38-. Además, se observó expresión de las moléculas HLA-ABC y HLA-DR, así como CD80, CD86 y PD-L1 (Figura 55) confirmando la capacidad de presentación antigénica, tal y como se espera de una línea de LB. No se detectaron anticuerpos en el sobrenadante del cultivo (datos no mostrados).

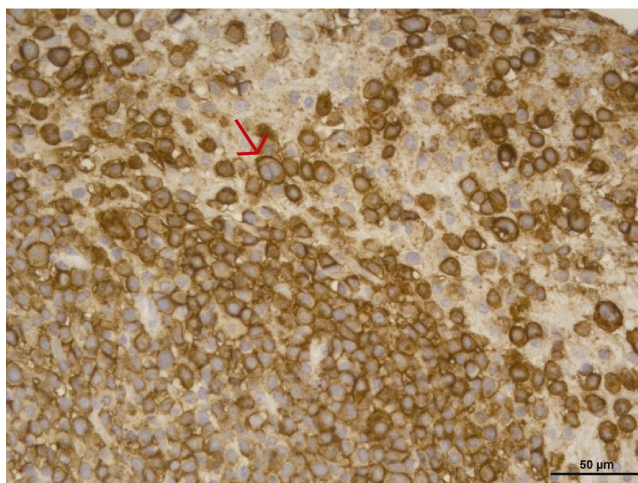


Figura 54. Tinción de CD20 por IHC en el tejido del tumor derivado de un cáncer de mama triple negativo implantado en un PDX. La tinción de CD20 por IHC en el tejido del tumor extraído del ratón mostró que el tumor obtenido estaba formado mayoritariamente por LB CD20+. Se observan células con un núcleo bilobulado tales como las células Reed-Sternberg asociadas al linfoma de Hodgkin (señalada con una flecha roja).

Teniendo en cuenta que los ratones usados para la generación de PDX eran NSG y, por lo tanto, no contenían sistema inmune propio, el origen del linfoma de LB debía ser humano, confirmado por el hecho de que las tinciones se realizaron con anticuerpos anti-humanos. Aun así, y para confirmar que las células B provenían de la paciente, se realizó el genotipado en alta resolución del HLA, tanto de la XAL-LCL como de los PBMCs de la paciente, y se confirmó el mismo tipaje (HLA-A*02:01, A*30:02, B*18:01, B*49:01, Cw*05:01, Cw*12:03, DRB1*03:01, DRB1*11:01, DQB1*02:01, DQB1*03:01).

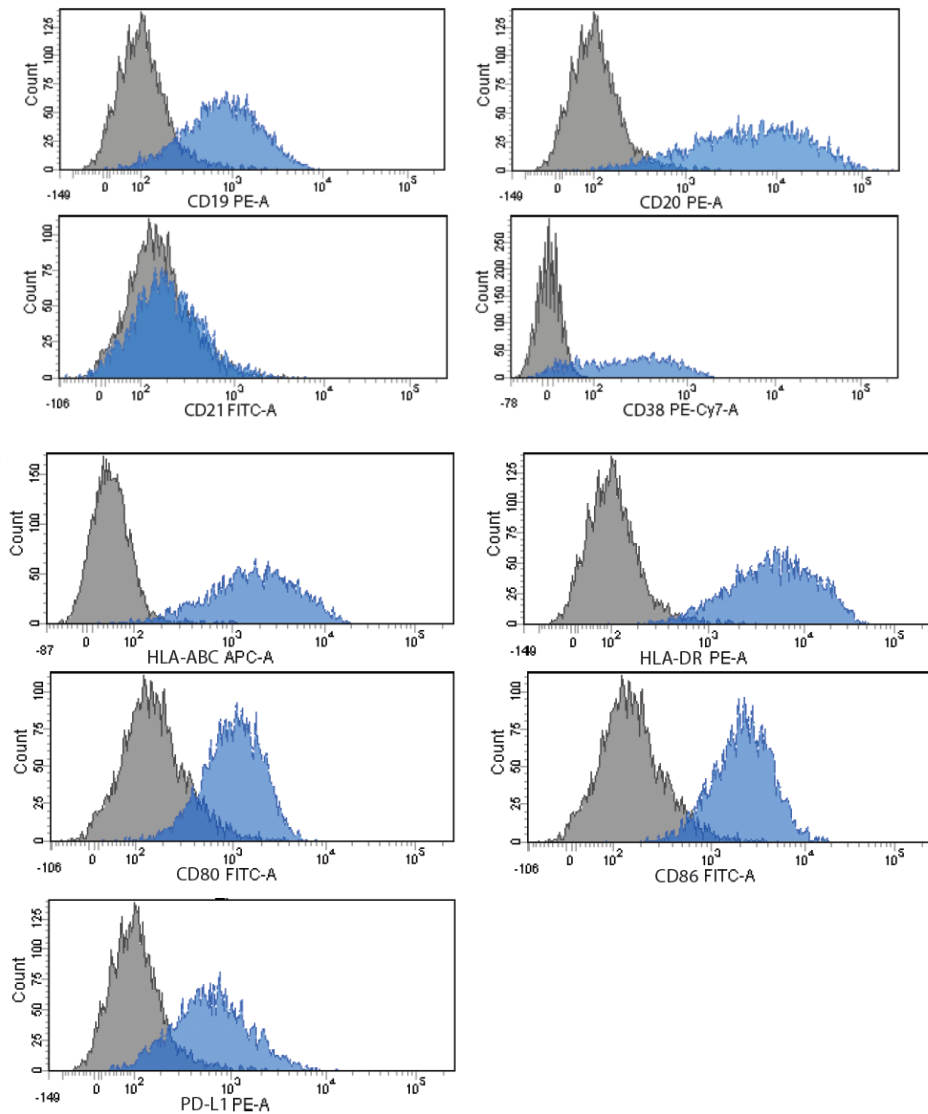


Figura 55. Tinciones por citometría de flujo de las células digeridas del tejido del PDX de los marcadores de LB CD19, CD20, CD21, CD38 y de las moléculas de presentación de antígeno y coestimuladoras HLA-ABC, HLA-DR, CD80, CD86 y PD-L1. Las células digeridas expresaban las moléculas CD19, CD20 y CD38, pero no CD21. También expresaban las moléculas de HLA-ABC como HLA-DR, así como las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y PD-L1, confirmando que los LB tienen capacidad de presentación antigénica.

Uno de los orígenes de linfoma de células B más comunes es la infección por EBV y, además, es utilizado para generar LCL *in vitro*. Por ello, se buscó la presencia del virus por qPCR. Tanto los PBMCs de la paciente como las células del tumor linfocítico en cultivo resultaron EBV+. Sin embargo, no se detectó en los T-TILs derivados de la biopsia de mama.

Por último, y para confirmar que las células B que originaron un linfoma en el ratón procedían del infiltrado tumoral de la biopsia de mama inoculada, se realizó la secuenciación del BCR mediante HTS, tanto del tejido tumoral linfocítico como de las células en cultivo. Se detectó una sola secuencia – CAKDVTDVSAYYYQAEYFPHW (IGHV03-23) – representando más del 97 % del repertorio en ambas muestras (datos suplementarios, Aran et al.³⁹³), confirmando una expansión monoclonal producida antes del establecimiento de la línea celular *in vitro*. Seguidamente, se realizó la secuenciación del BCR en el tejido de la biopsia de mama 562 y se encontró la misma secuencia entre el repertorio de B-TILs.

En conjunto, se confirmó que los LB que originaron un linfoma de células B en el ratón (de ahora en adelante XAL, del inglés *xenograft-associated lymphoma*) estaban originariamente presentes dentro del infiltrado tumoral de la paciente y se transformaron en un tumor monoclonal linfocítico dentro del ratón. Además, estas células se mantuvieron como línea celular linfocítica (de ahora en adelante, XAL-LCL) *in vitro*, debido a su etiología tumoral.

4.2.2. La línea XAL-LCL mostró capacidad de mantener T-TILs tanto *in vitro* como *in vivo*

Se realizaron tinciones por IHC en secciones de tejido del XAL obtenidas tras cada pase en ratones y se observaron LT CD3+ infiltrando el tumor después del primer pase (Figura 56), pero no en los siguientes. No obstante, podría ser que se hubiesen mantenido LT, pero no en suficiente abundancia para ser detectados por IHC. Para esta comprobación, se realizó la secuenciación del TCR por HTS del tejido XAL y se identificaron, tras el tercer y último pase y después de 6 meses en ratones, 43 secuencias CDR3, con una secuencia más prevalente representando el 31.8 % (datos suplementarios, Aran et al.³⁹³).

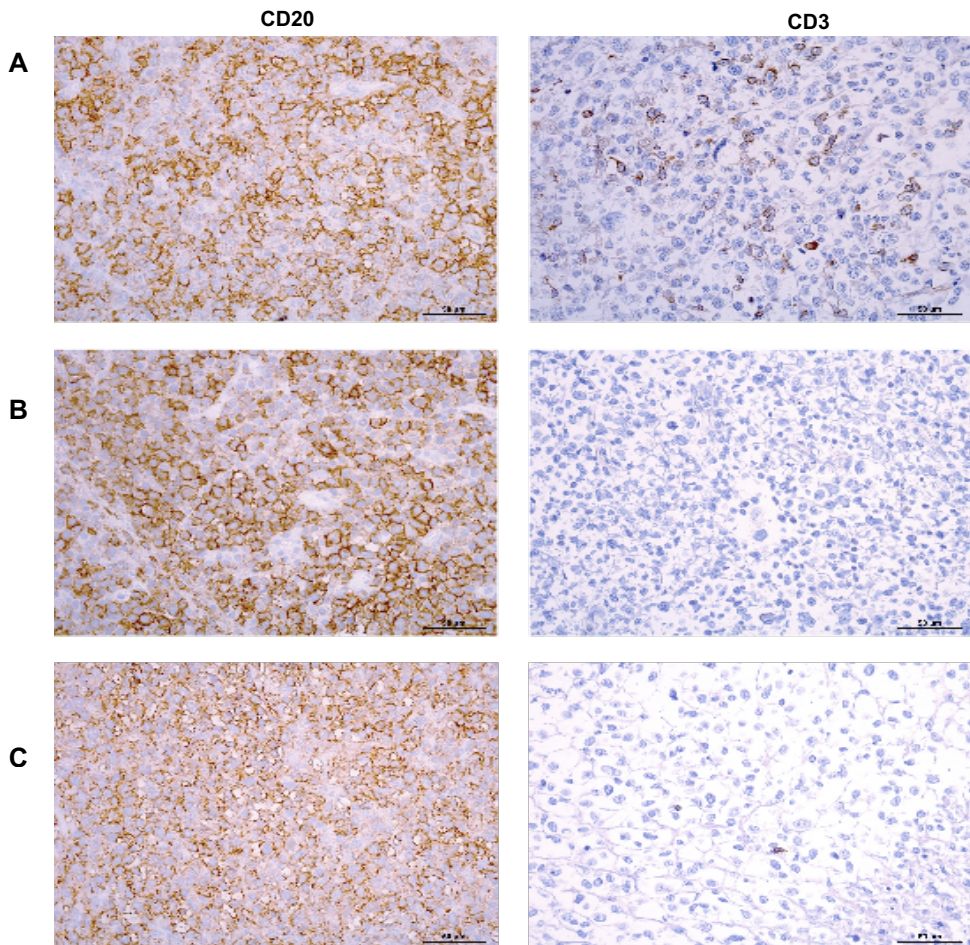


Figura 56. Tinciones por IHC de CD20 y CD3 en los tumores obtenidos tras cada pase en ratón. (A) El tejido obtenido tras el primer pase en ratón PDX inoculado con el tumor mamario de la paciente muestra una mayoría de LB CD20+ y se encuentran LT CD3+ infiltrantes. (B) Tras el segundo pase y (C) tras el tercer pase, se observa una mayoría de LB CD20+, pero no se observan LT CD3+ infiltrantes.

Para comprobar que los LT encontrados en el tejido del XAL procedían de la biopsia humana, se realizó la secuenciación del TCR en las muestras del tejido de la biopsia 562, así como en los T-TILs en cultivo procedentes de la misma. De forma esperable, se obtuvieron muchas más secuencias, en total, 26724 y 5451 en el tejido de la biopsia y en los cultivos de T-TILs, respectivamente. De estas, 1144 fueron encontradas en los dos grupos (Figura 57A), y 18 secuencias fueron encontradas en el tejido del XAL y en los cultivos de T-TIL y/o el tejido de la biopsia; 13 secuencias en común se encontraron en el tejido de la biopsia y el tejido del XAL, una entre los cultivos T-TIL y el tejido del XAL y cuatro en común en los tres grupos. De las cuatro porciones

Capítulo IV. Resultados

puestas en cultivo de la biopsia 562, solamente en una de ellas se encontraron dichas secuencias compartidas (562.6, ver página 53).

Seguidamente, se realizó un análisis de las secuencias encontradas en los tejidos de la biopsia humana, del XAL y en los cultivos, con tal de estudiar sus abundancias en cada una de estas muestras. Para ello, se compararon mediante las 50 secuencias más abundantes de las muestras y se observó un patrón distinto entre los tres grupos, especialmente diferente en el del tejido del XAL (Figura 57B), indicando que los clones infiltrantes en este tumor, y después de seis meses en ratones, no eran los más abundantes en el tumor de mama originalmente, así como tampoco en los cultivos de T-TILs. Por ello, se concluyó que los B-TIL que formaron el tumor linfocítico en el ratón tenían la capacidad de mantener ciertos T-TIL y confirmando el rol de los LB como APC en el microambiente tumoral.

Para estudiar si el efecto de los LB en el ratón podía ser replicado *in vitro*, se usaron los T-TIL de la porción 562.6 de la biopsia y se realizaron cocultivos usando la línea XAL-LCL como estimuladoras. Como control, se realizaron expansiones de los mismos T-TIL en presencia de OKT3 (anti-CD3 humano soluble procedente de hibridoma OKT3). Tras los cultivos, se analizó el repertorio de TCR y los cambios fenotípicos, mediante HTS y citometría de flujo, respectivamente. La secuenciación del TCR reveló un bajo número de secuencias (73 secuencias) y una baja diversidad tras los cocultivos con las células XAL-LCL (Figura 58A). Además, se observó un grupo de clones en alta abundancia en los cultivos T-TIL iniciales que se mantuvieron en frecuencias similares tras los cocultivos, pero no tras las expansiones control, indicando cierta restricción debido a la presencia de los LB como células estimuladoras (Figura 58B).

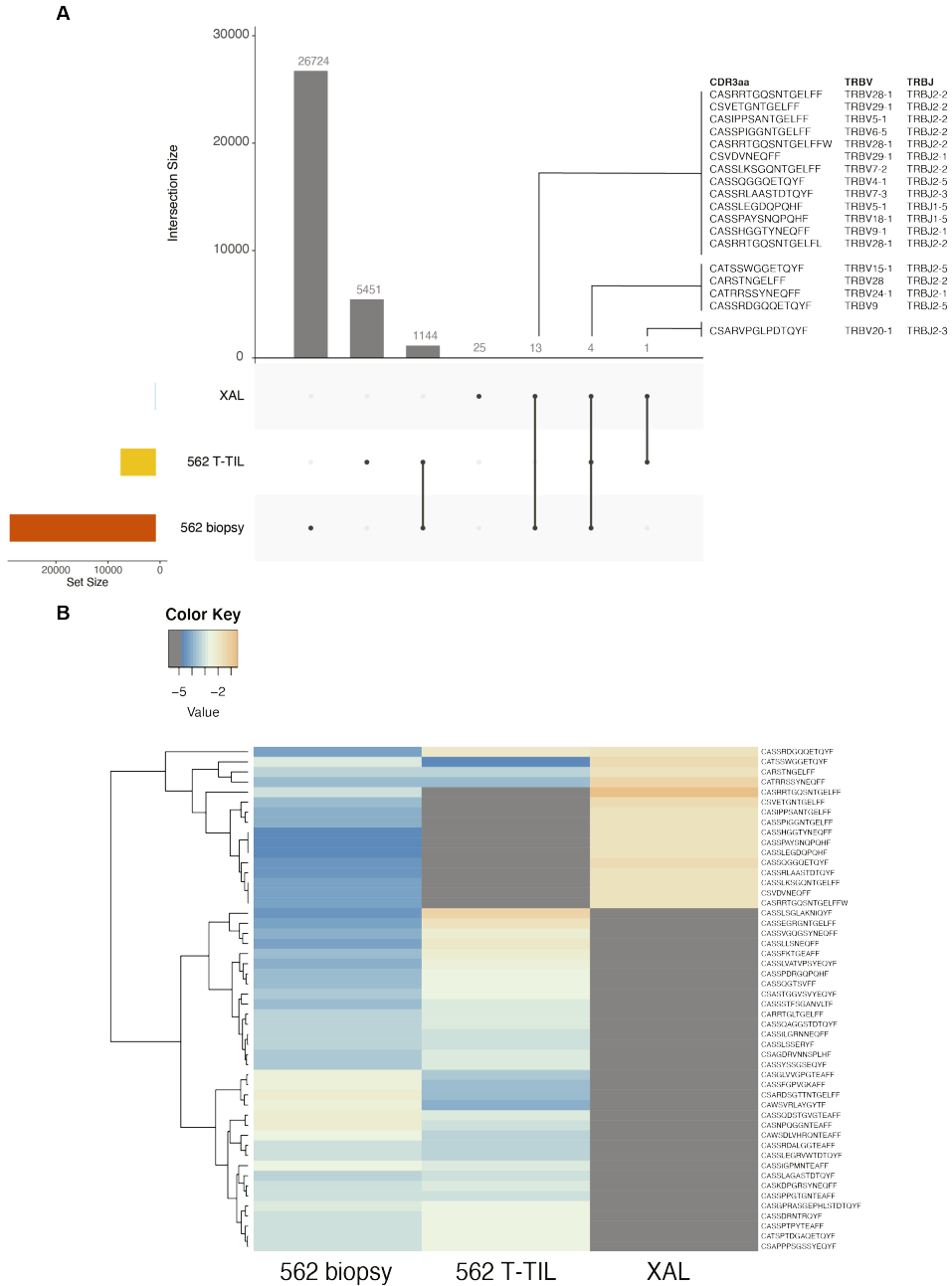


Figura 57. Secuencias de TCR obtenidas del tejido del XAL, de la biopsia de cáncer de mama 562 y de los cultivos de T-TIL derivados de la biopsia. (A) Los *Upset plots* representan el número de secuencias CDR3 compartidas entre las muestras. Dieciocho secuencias se encuentran en el tejido del XAL y/o en los tejidos de la biopsia 562 y los cultivos de T-TIL procedentes de la misma. Veinticinco secuencias se encuentran exclusivamente en el tejido del XAL. (B) Las 50 secuencias más abundantes compartidas entre muestras muestran un patrón global del repertorio de TCR distinto en el tejido del XAL y más similar entre la biopsia 562 y los cultivos de T-TIL.

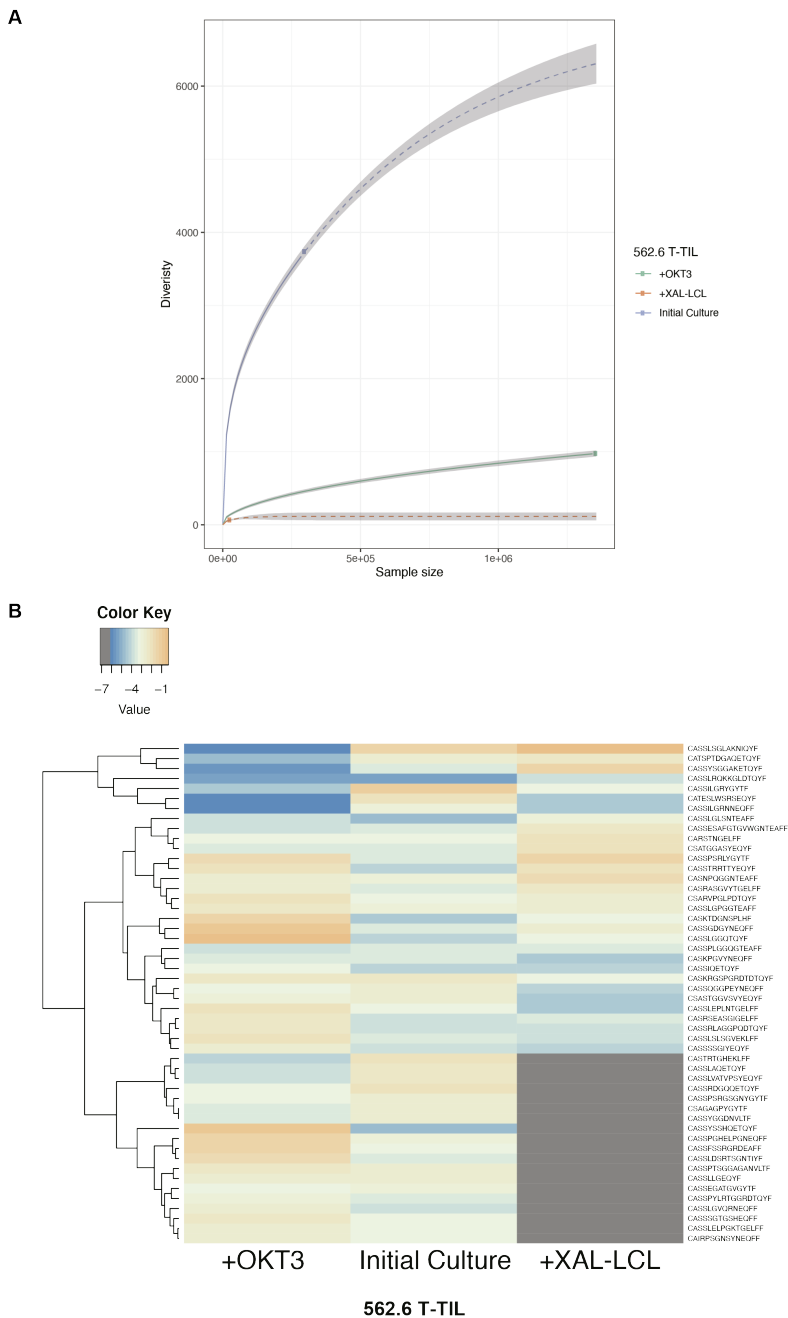


Figura 58. Diversidad de TCR y cambios en el repertorio de secuencias tras las expansiones de los T-TIL 562.6 cocultivados con las XAL-LCL. (A) Se observa una drástica reducción del tamaño y la diversidad del repertorio tras el cocultivo de los T-TIL con las XAL-LCL irradiadas (a 60Gy), incluso más reducida que la observada tras las expansiones con OKT3 (anti-CD3 humano). (B) El *heat plot* usando las 50 secuencias CDR3 más abundantes compartidas entre muestras revela un patrón distinto de los T-TIL tras ser expandidas con las XAL-LCL, en vez de con OKT3, dado que varias secuencias no se encuentran tras las expansiones y se observan distintas frecuencias de las compartidas.

De las cinco secuencias que habían sido encontradas tanto en el tejido XAL como en los cultivos de T-TILs (Figura 57A), solamente dos de ellas se mantuvieron tras los cocultivos: CARSTNGELFF (TRBV28) y CSARVPGLPDTQYF (TRBV20-1 (Figura 59A). Estas dos secuencias también se encontraron en los cultivos control, expandidos con OKT3, pero la fracción normalizada de la secuencia CARSTNGELFF fue mayor después del cocultivo con las células XAL-LCL en comparación con el control. El análisis fenotípico (Figura 59B) mostró, como principal diferencia, un decrecimiento de LT doble negativos (CD4-CD8-), que representaron el 41.8 % en los cultivos iniciales de T-TIL y un 1.34 % tras los cocultivos. En su lugar, se observó un crecimiento considerable del porcentaje de T-TIL CD4+, que pasó de un 15 % a un 43.6 % después de los cocultivos. Los T-TIL CD8+, sin embargo, se mantuvieron en porcentajes similares, representando un 40.6 % y un 52.1 % en los cultivos iniciales y tras los cocultivos, respectivamente. En conjunto, los resultados obtenidos tras las expansiones *in vitro* confirmaron la selección de TCR y algunos cambios fenotípicos en el conjunto de T-TILs, sugiriendo un rol de los B-TIL EBV+ en el moldeamiento del repertorio, incluso tras la conversión de los LB del XAL a una LCL.

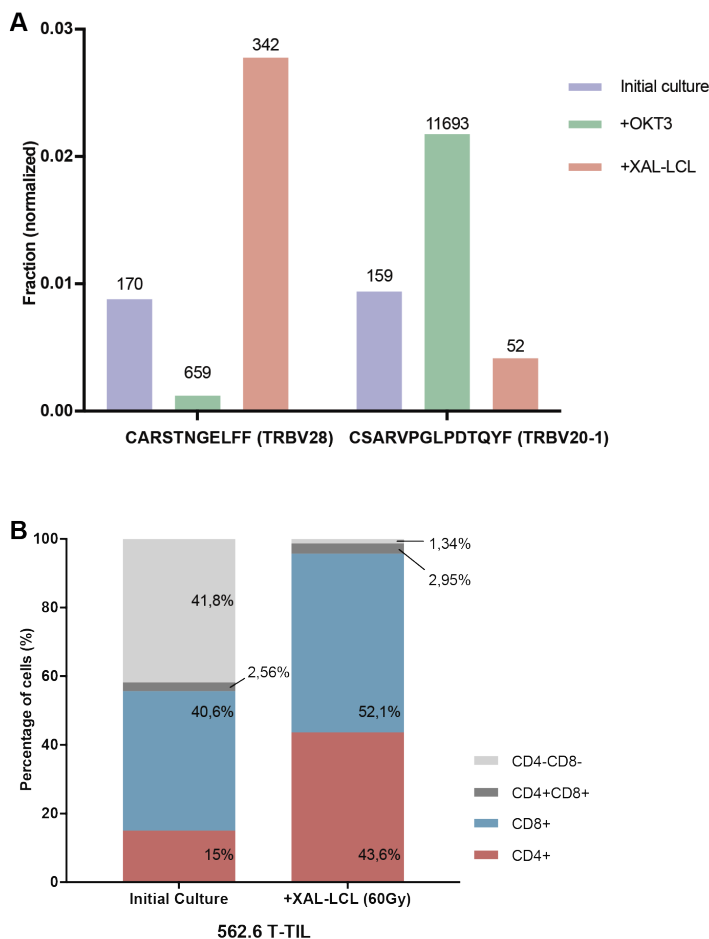


Figura 59. Cambios en las secuencias encontradas antes y tras los cocultivos de los T-TIL 562.6 con las XAL-LCL y en los porcentajes de subpoblaciones de LT. (A) Las fracciones normalizadas de las dos secuencias CDR3 que también se encontraron infiltrando el tejido del XAL. La secuencia CARSTNGELFF representa una fracción más pequeña en el control (0,0012) en comparación con la de los cultivos iniciales (0,0088), pero una fracción más alta después de los cocultivos (0,027). La secuencia CSARVPGLPDTQYF CDR3 está sobre-expandida en el control (0,0217) en comparación con el cultivo inicial (0,0094) y con los cocultivos (0,0042), representando una fracción menor en este último. El número de *reads* de ambas secuencias en cada conjunto se muestra arriba de las barras. (B) El fenotipo de los T-TIL 562.6 en el cultivo inicial (10 días) y después del cocultivo con las XAL-LCL irradiadas (60Gy). El subtipo más abundante en la primera muestra fue el de DN (LT dobles negativos CD4-CD8-) en un 41,8 %, seguido de los LT CD8+ en un 40,6 %. Tras el cocultivo, los LT CD8+ representan un 52,1 % y los LT CD4+ en un 43,6 %, mientras que el subtipo de DN disminuye a un 1,34 %.

Para comprobar si las secuencias seleccionadas tanto *in vivo* (43 secuencias encontradas en el tejido del XAL) como *in vitro* (73 secuencias encontradas tras los cocultivos con XAL-LCL) habían sido descritas anteriormente, se buscaron en la base de datos Mc-PAS-TCR¹⁰⁰ (Figura 60). Ninguna de las cinco secuencias encontradas

en común en el tejido del XAL y los T-TIL había sido previamente descrita en la literatura. De los 43 clones infiltrando el tejido del XAL, 10 habían sido descritos anteriormente, todos ellos descritos como secuencias de reconocimiento de patógenos, aunque la mitad también se habían descrito en autoinmunidad (dos secuencias) y cáncer (dos secuencias). Una de ellas se había descrito en las tres categorías (CASSLEGDQPQHF). De las 73 secuencias obtenidas de los T-TIL expandidos *in vitro* en cocultivos, 13 de ellas se encontraron en la base de datos: diez como secuencias de reconocimiento de patógenos, dos exclusivamente en autoinmunidad y una en cáncer. Dos secuencias (CASSGGGAYNEQFF y CASSIQETQYF) se encontraron en los tres grupos, pero cabe destacar que la secuencia CASSIQETQYF había sido reportada un total de seis veces en autoinmunidad, tres en infección y 17 en cáncer y, en este último grupo, había sido descrita como secuencia neoantígeno-específica.

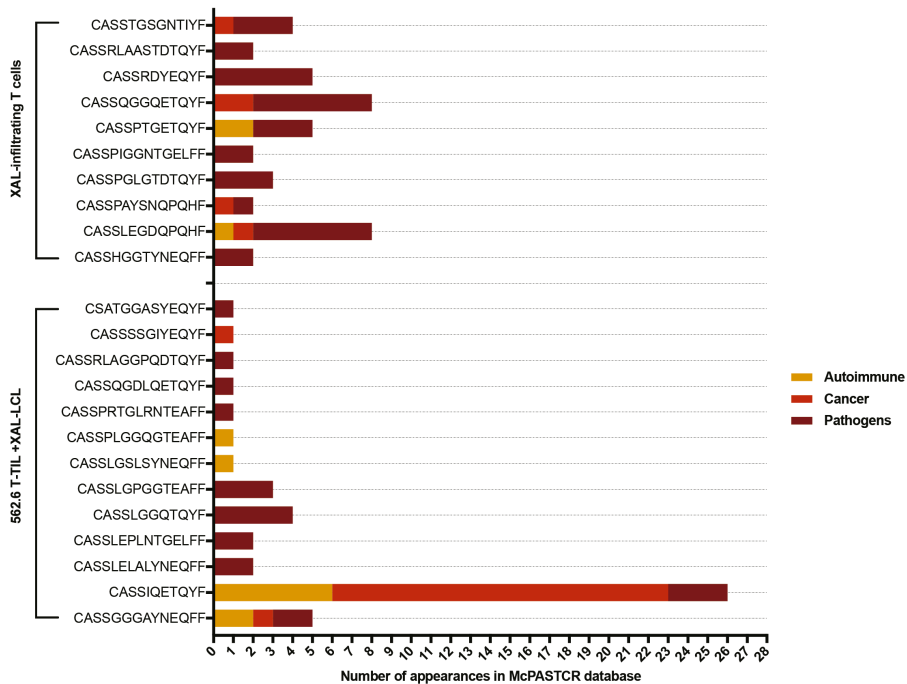


Figura 60. Las secuencias de TCR del tejido del XAL y de los T-TIL 562.6 expandidos con las XAL-LCL encontradas en la base de datos McPASTCR. Diez secuencias de los 43 clones (23 %) infiltrando el tejido del XAL se han descrito previamente como secuencias TCR que reconocen patógenos. De estos, el 50 % también se han descrito en enfermedades no transmisibles, (cáncer y autoinmunidad). Una de las secuencias se ha identificado en las tres patologías. En los T-TIL 562.6 expandidos *in vitro* en presencia de las XAL-LCL se encontraron descritas en la literatura 13 secuencias; ocho, dos y una de estas han sido identificadas exclusivamente en infecciones por patógenos, autoinmunidad y cáncer, respectivamente, y dos secuencias se han descrito en las tres categorías, pero notablemente la secuencia CASSIQETQYF ha sido identificada varias veces en cáncer.

4.2.3. Caracterización de los péptidos asociados a HLA presentados por la línea XAL-LCL

Se realizó un estudio del peptidoma asociado a las moléculas de HLA de las células XAL-LCL, con el objetivo de encontrar proteínas que pudieran ser presentadas por estas células y poco comunes en líneas LCL transformadas *in vitro*. Se eluyeron los péptidos asociados a las moléculas de HLA y se analizaron mediante espectrometría de masas (ver página 67). Se obtuvo un total de 1572 y 1004 péptidos, correspondientes a 1090 y 444 proteínas, asociadas a moléculas de HLA-ABC y HLA-DR, respectivamente. No se encontró ningún péptido derivado de EBV. Se excluyeron los péptidos duplicados, i. e., secuencias iguales con modificaciones post-traduccionales, se seleccionaron por tamaño y se excluyeron los péptidos derivados de queratinas. Tras la selección, restaron 1392 y 834 péptidos, derivados de 1072 y 353 proteínas de origen, asociados a las moléculas de HLA-ABC y HLA-DR, respectivamente. Los péptidos seleccionados encajaban correctamente con los patrones de tamaño de péptidos presentados por moléculas de clase I y de clase II (Figura 61A). De forma similar, la sublocalización celular dada por UniProt¹⁰³ de las proteínas fuente también se correspondía con las distintas vías de HLA, mostrando un mayor número de proteínas fuente derivadas de membrana y de la vía endocítica en los péptidos derivados de HLA-DR comparado con los de HLA-ABC (Figura 61B). Se encontraron péptidos formando *nested sets* en los péptidos derivados de HLA-DR. Se realizó un análisis de agrupamiento mediante Gibbs que reveló motivos que coincidían con los de los alelos HLA de las células XAL-LCL.

Dado que las células B, tanto del tejido XAL como de la línea XAL-LCL, mostraron la capacidad de mantener algunos clones LT, se verificó si el inmunopeptidoma presentado por las células XAL-LCL era relevante. Para ello, y con el fin de excluir proteínas comúnmente procesadas y presentadas, se comparó el repertorio de péptidos con los repertorios de péptidos LCL descritos en la literatura. Se seleccionaron seis estudios¹⁰⁸⁻¹¹³ en los cuales se describe el repertorio de péptidos asociados a HLA-ABC en distintas líneas LCL (de 7, 11 y 9 alelos de HLA-A, -B, y -C distintos, respectivamente), y de los que se recopilaron un total de 26305 proteínas fuente. Los péptidos se filtraron, excluyendo los derivados de proteínas descritas en estos estudios. Se realizó el mismo procedimiento con los péptidos asociados a HLA-DR, usando una base de datos de LCL creada a partir de la literatura, que contenía 517 proteínas fuente de 10 estudios diferentes y 11 haplotipos de HLA distintos¹¹⁴⁻¹²³. Tras el filtrado, se realizó un análisis de predicción de afinidad mediante el NetMHCIIpan¹⁰⁷ (ver página 67) y se seleccionaron aquellos predichos como péptidos de alta afinidad. Se obtuvieron 195 péptidos con una predicción de alta afinidad para los alelos de HLA-ABC y 223 para los alelos de HLA-DR. Las secuencias filtradas correspondían a 178 y 102 proteínas, respectivamente, representando un 16 % y un 23 % del total de proteínas fuente de clase I y de clase

II, respectivamente, presentadas por la XAL-LCL. Se realizó un análisis de rutas KEGG de las proteínas fuente (usando la herramienta DAVID^{293,294} y los dos primeros resultados obtenidos fueron las vías de procesamiento y presentación de antígeno ($p = 1.14E-4$) y del fagosoma ($p = 6.6E-3$), indicando que el rol mayoritario de estos LB es la presentación antigénica.

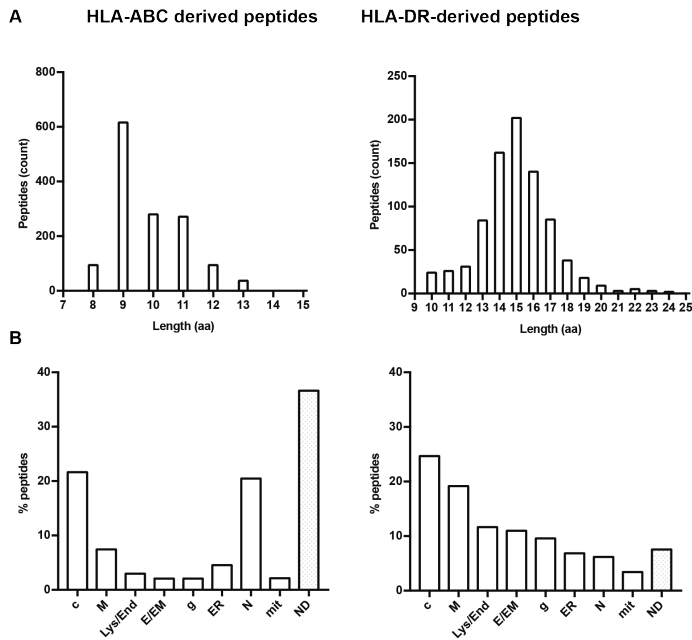


Figura 61. Distribución del tamaño de los péptidos y la localización celular de las proteínas de las cuales derivan de los péptidos asociados a HLA-ABC y HLA-DR obtenidos de las XAL-LCL. (A) La distribución por tamaño de los 1392 y 834 péptidos asociados a las moléculas de HLA-ABC y HLA-DR, respectivamente, tras el pre-filtrado. Se muestra una dominancia de péptidos 9-mer en clase I y una distribución Gaussiana con mayor abundancia de péptidos 15-mer en clase II, denotando repertorios fiables. (B) La distribución intracelular de las proteínas fuente, en porcentaje, según los datos obtenidos de la base de datos Uniprot. c, citosol; M, membrana; Lys/End, lisosoma y endosoma; E/EM, exógenos y matriz extracelular; g, Golgi; ER, retículo endoplasmático; N, núcleo; mit, mitocondria y; ND, no definidos.

Finalmente, se estudió si existía una relación con el cáncer en las proteínas restantes tras el filtrado, usando las descripciones del Human Protein Atlas^{124–126}. Para ello, se usaron las proteínas identificadas, los péptidos y el número de espectros identificados para cada péptido (PSM, del inglés peptide spectral match). Un valor más alto de PSM está relacionado con una mayor abundancia del péptido presentado. La mayoría de las proteínas analizadas se expresan o están enriquecidas en varios tejidos en cáncer, nombradas proteínas de baja especificidad en cáncer (low cancer specific proteins) (Figura 62). En el repertorio asociado a HLA-ABC, solo se encontraron dos proteínas enriquecidas en cáncer y un alto número de proteínas sin suficientes datos disponibles. De forma interesante, en el repertorio asociado a HLA-

Capítulo IV. Resultados

DR, se encontraron varias proteínas específicas en ciertos tipos de cáncer, como en el de tiroides (ocho péptidos y 280 PSM), glioma (seis péptidos y 203 PSM) y de hígado (seis péptidos y 146 PSM).

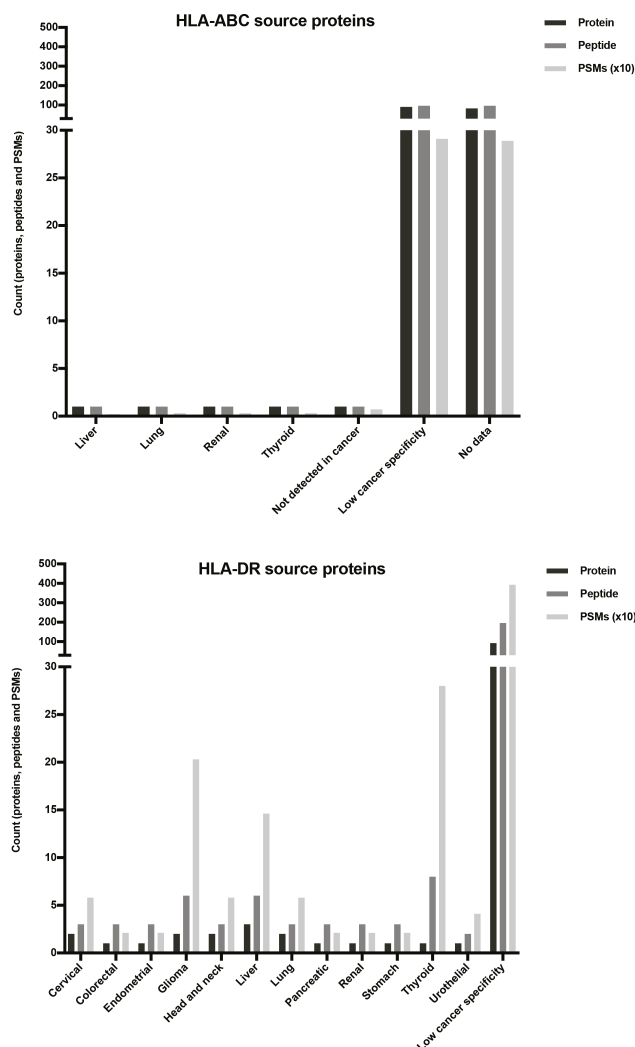


Figura 62. Distribución de las proteínas seleccionadas tras el filtrado de péptidos asociados a HLA-ABC y HLA-DR en función de su expresión en distintos tipos de cáncer según datos del Human Protein Atlas. Se representan los recuentos de proteínas, de péptidos y de PSM obtenidos. (A) De las 178 proteínas origen de los péptidos asociados a HLA-ABC, solamente dos de ellas muestran especificidad en ciertos tipos de cáncer. El recuento más alto en todas las medidas (proteínas, péptidos y PSM) corresponde a proteínas con baja especificidad en cáncer, es decir, enriquecidas en muchos tejidos cancerosos. (B) De las 102 proteínas origen de los péptidos asociados a HLA-DR, de nuevo, el recuento más alto es de proteínas de baja especificidad en cáncer. Se muestran también 280 PSM de ocho péptidos contenidos en un *nested set* derivados de una proteína específica de cáncer de tiroides, 203 PSM y seis péptidos derivados de dos proteínas específicas de glioma y 146 PSM de seis péptidos derivados de tres proteínas específicas de cáncer de hígado.

4.3. Discusión

Los tumores pueden modular la acción del sistema inmunitario generando un microambiente adverso y expresando puntos de control inmunitario (o *immune checkpoints*) que, en general, favorecen una respuesta inmunitaria reguladora³⁹⁴. Los tratamientos con ICPI (del inglés, *immune checkpoint inhibitors*) tales como el pembrolizumab o el nivolumab y el ipilimumab, que bloquean los receptores PD-1 y CTLA-4, respectivamente, han aumentado la supervivencia de los pacientes³⁹⁵. Al mismo tiempo, el bloqueo de estas moléculas puede desencadenar la interrupción de la homeostasis inmunitaria, provocando eventos adversos relacionados con el sistema inmunitario, también conocidos como irAE (del inglés, *immune related adverse events*)²⁵⁴. La relación entre la infección causada por ciertos virus humanos y el desarrollo de procesos autoinmunes e inflamatorios también ha sido propuesta varias veces^{353,392,396}. Por lo tanto, la presencia de LB EBV+, así como otras células infectadas por virus, en un microambiente inmunomodulado y junto con los tratamientos con ICPI puede ser un factor adicional con un rol en el desarrollo de irAE.

En los últimos años, varios grupos han analizado la asociación entre el desenlace del cáncer con la infección por diferentes especies de herpesvirus humanos (HHV) – como el EBV (o HHV-4)³⁹⁷ y el citomegalovirus (CMV o HHV-5)³⁹⁸ – o de retrovirus – como el virus humano linfotrópico T (HTLV)³⁹⁹. Sin embargo, todos estos estudios se centran en el papel directo de los virus en el desarrollo de tumores, pero no en la contribución de la respuesta antiviral a la respuesta antitumoral. En esta parte del estudio, hemos podido analizar diferentes factores relacionados con la inmunidad y asociados con la presencia de LB EBV+ entre los TIL. Para ello, se usaron dos biopsias obtenidas de una paciente con cáncer de mama TN (antes de la quimioterapia neoadyuvante). Una de ellas, se usó para el estudio de T-TIL derivados del tumor, mientras que la otra se usó para la generación de un PDX, del que se obtuvo un tumor linfocitario XAL, usado para estudiar los B-TIL EBV+ (y estabilizadas como una línea celular nombrada XAL-LCL).

La IHC realizada en la biopsia de la paciente reveló por primera vez que la mayoría de los T-TIL CD3+ encontrados en la sección histológica eran LT CD4+ colocalizados con células CD20+, mientras que los LT CD8+ estaban localizados más cerca del tumor en el frente infiltrante de la neoplasia. Esto sugeriría una posible interacción *in situ* entre los LB y los LT *helper* (Th). Dado que los LB pueden actuar como APC profesionales, la presencia de estos, incluso cuando no son específicos de tumor, puede contribuir a moldear el escenario tumoral. El papel de los LB como un supuesto inductor de la respuesta por LT en el microambiente tumoral en el cáncer de mama sigue sin ser muy claro¹⁹⁵.

El XAL generado a partir de la biopsia de cáncer de mama resultó en un tumor linfocítico; los LB que generaron la línea XAL-LCL eran CD19+, CD20+, CD21- y

CD38+, un fenotipo típico de LB activados de centro germinal. Confirmamos que tanto las XAL-LCL como la paciente eran EBV+. Esto no fue sorprendente ya que hasta el 40 % de los linfomas de Hodgkin están asociados con el EBV y las LCL se generan *in vitro* usando este mismo virus. Teniendo en cuenta que el EBV se detecta en más del 90 % de la población adulta mundial⁴⁰⁰ y la capacidad del EBV de mantenerse de por vida en un estadio latente, no es inesperado que entre los TIL haya LB EBV+. Previamente, también había sido descrito el desarrollo de neoplasias linfocíticas EBV+ en PDX derivados de cáncer de mama³⁷⁸. Esto puede explicarse por la falta de sistema inmune maduro en los modelos PDX, que son ratones NSG, y la evidencia de que la infección por EBV conduce con mayor frecuencia a trastornos linfoproliferativos en contextos inmunosupresores^{388,401,402}. No tenemos conocimiento de que los tumores XAL se hayan utilizado con anterioridad como modelo para investigar el papel de los LB EBV+ infiltrantes de tumor.

El análisis de los BCR del XAL reveló una secuencia BCR única que representaba la fracción principal tanto en el tejido como en la LCL. Esto confirmó que la conversión a un tumor linfocítico se produjo en los ratones y no por el establecimiento de un LCL *in vitro*. Analizamos el repertorio de BCR en la biopsia inicial del paciente y esta secuencia de BCR se encontró en el tejido tumoral., entre muchas otras secuencias de BCR.

Interesantemente, la sección histológica obtenida del primer paso del tumor XAL reveló algunos LT CD3+ infiltrando el tumor. La secuenciación de los TCR confirmó que algunos LT aún se mantenían después del tercer pase en el ratón. Se obtuvieron 43 clones distintos de los cuáles 18 también se encontraron, o bien en el tejido congelado del tumor de cáncer de mama, o en las células T-TIL expandidas de la biopsia. El mantenimiento de los LT en el XAL durante los tres pases en ratones puede ser el resultado de la estimulación de los LB que conformaban el XAL y que expresaban, además, las moléculas de HLA-I y HLA-II, así como de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y PD-L1. En general, en LB EBV+, se observa una mayor expresión de las moléculas de HLA³⁹⁶. Además, se observó un patrón de TCR distinto en las muestras de la biopsia de CM, en comparación con el del XAL, lo que sugiere que los LB del XAL estaban seleccionando ciertos clones. Por este motivo, utilizamos los T-TIL procedentes de la biopsia para realizar cocultivos usando las XAL-LCL irradiadas, para estudiar si también se podía observar una selección de LT *in vitro*. Tras la interacción con las XAL-LCL, se identificaron 73 clones y se observó una diversidad del repertorio de TCR disminuida. Dos de las secuencias CDR3 expandidas se habían encontrado previamente en el XAL, la secuencia CARSTNGELFF (TRBV28) y la CSARVPGLPDTQYF (TRBV20-1). Ciertos clones encontrados en los cultivos iniciales se mantuvieron en frecuencias similares tras las expansiones con las XAL-LCL, pero no en las expansiones control. Por lo tanto, estos

resultados, en conjunto, sugieren que algunos LB EBV+ pueden estimular los T-TIL, induciendo una cierta restricción del repertorio de TCR.

Se analizó el repertorio de péptidos presentado por HLA-ABC y HLA-DR en las XAL-LCL. No encontramos péptidos derivados de EBV ni en el análisis de clase I ni en el de clase II, lo cual puede ser debido a que solamente una única proteína viral, EBNA1, es expresada en todas las enfermedades malignas asociadas a EBV⁴⁰³. La ubicación subcelular de las proteínas de origen de los péptidos presentados mostró un patrón común a los repertorios de otras líneas de LB^{312,313}. El análisis de agrupamiento (o *clustering*) obtenido reveló dos motivos de unión que coincidían con el haplotipo HLA de la paciente. Cabe mencionar que en el estudio de los péptidos asociados a HLA-DR, la proteína más abundante fue la GAPDH y, pese a que es una proteína comúnmente encontrada, no es tan frecuente encontrarla en gran abundancia. Se ha descrito una relación de GAPDH con el cáncer de mama^{404,405}, por lo que podría ser interesante, en un futuro, profundizar en el análisis de la relevancia de los péptidos derivados de GAPDH que presentan estas células.

Existen varios estudios del repertorio HLA clase I y clase II usando LCL, pero los LB son transformados *in vitro*, mientras que los LB del XAL usados en este estudio fueron infectadas y transformadas por el EBV *in vivo*. Por lo tanto, podría haber diferencias en el repertorio de péptidos entre estas células y una LCL común. Con tal de estudiar si existían estas diferencias, excluimos todas las proteínas fuente de péptidos (iguales o distintos) presentados por LCL encontradas en la literatura, independientemente para las proteínas de clase I²⁹⁸⁻³⁰³ y las de clase II³⁰⁴⁻³¹³. Las proteínas restantes filtradas representaron un 16 % y un 23 % del total de proteínas origen de los péptidos asociados a HLA-ABC y HLA-DR, respectivamente. Estas proteínas están principalmente involucradas en el procesamiento y presentación de antígenos y en las vías de los fagosomas. Esto indica que estas células tienen un porcentaje considerable de proteínas diferentes en comparación con otras LCL y que estos LB todavía tenían un papel importante como APC.

Por otro lado, basándonos en la información publicada en el Human Protein Atlas³¹⁴⁻³¹⁶, se encontró que la mayoría de los péptidos restantes después del filtrado derivan de proteínas que pueden estar presentes o enriquecidas en muchos tejidos cancerosos, catalogadas como proteínas con baja especificidad en cáncer (o *low cancer-specificity*). No obstante, también se encontraron algunas proteínas enriquecidas en cáncer, especialmente en el análisis de los péptidos asociados a HLA-DR. Por lo tanto, en un microambiente tumoral, estos LB pueden presentar péptidos derivados de proteínas autólogas y enriquecidas en cáncer. En un futuro, estos péptidos deberían usarse *in vitro* por separado para analizar si son capaces de estimular a los T-TIL.

Varias características de los LB EBV+ las hacen relevantes en el contexto tumoral. Debido a que las células tumorales regulan a la baja la expresión de moléculas de HLA

para escapar de la respuesta inmunitaria, la activación y el mantenimiento de los T-TIL CD4+ y CD8+ en el sitio del tumor generalmente queda restringida a las APC. Recientemente, se ha considerado el papel de los LB como moduladores de la respuesta antitumoral⁴⁰⁶. Sin embargo, los LB EBV+ en estado latente son similares a los LB de memoria pero que han sido activados por vías de señalización similares a las producidas por la activación mediada por CD40L⁴⁰⁷, en ausencia de señalización por parte de los LT e independientemente de la especificidad de su BCR. Además, los LB EBV+ en estado latente tienen un transcriptoma atípico⁴⁰⁸. Por otra parte, y aunque los LT específicos del EBV se mantienen durante toda la vida participando en un control persistente de la infección, las capacidades inmunomoduladoras de las células tumorales que afectan al microambiente pueden dar al EBV la posibilidad de iniciar una fase infecciosa y escapar de la respuesta inmunitaria. Dos estudios recientes han reportado inflamaciones fatales (encefalitis³⁵³ y miocarditis³⁹²) en pacientes con melanoma tras el tratamiento con ICPI, en las que los LT específicas de EBV parecen estar involucrados. Aun así, los antígenos responsables de estas desregulaciones pueden no estar limitados a los antígenos derivados del virus.

En resumen, este estudio es una primera prueba de concepto que da relevancia a los LB EBV+ presentes en el sitio tumoral. No solo hemos demostrado su presencia, sino que también que estos están en un estado activado y son capaces de estimular los T-TIL. Nuestros datos también evidencian que los LB EBV+ pueden modular el repertorio de TCR, ya que se ha identificado un cierto patrón en este, y que algunas de las secuencias de TCR mantenidas ya han sido descritas con anterioridad en la literatura. También se han identificado ciertos péptidos poco comunes presentados por las moléculas de HLA-ABC y HLA-DR. Por lo tanto, aprovechar los tumores XAL que se generan en PDX puede ser una herramienta para comprender el papel de los LB EBV+ en los infiltrados tumorales y en cómo pueden contribuir a la resolución del cáncer al debido a su modulación del repertorio de TCR.

Discusión final

El estudio del TCR ha ganado un gran interés en los últimos años en la investigación en cáncer. Por un lado, el TCR es la molécula que confiere especificidad a los LT y, por lo tanto, el análisis del TCR de los T-TIL puede usarse para encontrar secuencias específicas de tumor. Por otro lado, tras la activación de los LT mediante el reconocimiento de los complejos p-MHC por parte de los TCR, los linfocitos se someten a expansiones clonales. Debido a que, en una expansión clonal, todos los linfocitos presentarán el mismo TCR, éstas se pueden monitorizar mediante la secuenciación del TCR.

En este trabajo se han encontrado diferencias en el repertorio de TCR de LT CD4+ y CD8+ que pueden, en parte, asociarse con las propias características de reconocimiento y función. Los T-TIL CD4+ son menos diversos y sus TCR presentan una mayor similitud, incluso entre individuos. Esto podría explicarse por una mayor promiscuidad de sus TCR, asociada a una mayor tendencia a la reactividad cruzada. La promiscuidad de los TCR es necesaria para asegurar la respuesta frente la gran variedad de patógenos y multitud de péptidos posibles derivados, teóricamente mayor al repertorio de TCR presente en un individuo⁴⁰⁹. Esto conlleva el riesgo a la generación de autoinmunidades, no solamente dirigidas por un péptido y alelo concreto, sino por el posible reconocimiento de varios péptidos, tal y como se ha descrito en un modelo NOD de diabetes⁴¹⁰ o en esclerosis múltiple^{411,412}. Sin embargo, esto supone una ventaja en la búsqueda de TCR reactivos contra el tumor, incrementando la posibilidad de encontrar TCR capaces de reconocer antígenos tumorales. Por otro lado, la disponibilidad de antígenos es uno de los factores más limitantes de la activación de Teff. En tumores con una alta tasa mutacional, es más probable que se generen neoantígenos que puedan inducir una activación específica contra las células tumorales, a pesar de que una exposición crónica puede desencadenar mecanismos propios de la tolerancia periférica, tales como la expresión de PD-1. En estos casos, favorecer una respuesta de tipo CD8+ dirigida a estos neoantígenos, así como el uso de ICI que puedan reactivarla, puede ayudar a la eliminación del tumor. En tumores en los que los antígenos que dirigen la respuesta son TAA y, por lo tanto, antígenos propios, es necesaria una presentación diferencial para romper la tolerancia, asociada a la dosis. En estos casos, los LT CD4+ debido a la promiscuidad de sus TCR podrían ser mejores candidatos para su uso en terapia. Este escenario también podría contribuir a la activación de Treg puesto que expresan TCR de mayor afinidad por los complejos p-MHC propios, pero, a su vez, esta mayor afinidad ha sido usada por el grupo de Rosenberg para dirigir la respuesta al antígeno de línea germinal MAGE-A3⁴¹³. El estudio demostró la seguridad y eficacia del uso de la terapia génica de TCR en cáncer metastásico con distintos orígenes.

Discusión final

De todo esto surge la duda de si los antígenos tumorales se presentan con la misma eficiencia a través de las vías de clase I y de clase II. Obviando que las células tumorales puedan regular a la baja la expresión de HLA-I, los antígenos tumorales tendrán su origen en proteínas del interior de la célula tumoral. Si la abundancia de la proteína no es un factor limitante y contiene motivos de unión a la molécula de HLA-I, su presentación es factible. Por el contrario, la presentación de HLA-II se ve limitada, en primer lugar, a la presencia de APC en el microambiente tumoral; en segundo lugar, a la accesibilidad de la proteína fuente del antígeno, teóricamente exógena la cual, en consecuencia, debe ser captada, procesada y presentada y, en tercer lugar, al propio motivo de anclaje de la molécula de HLA-II. Considerando estas diferencias en la presentación, un neoantígeno será probablemente más eficientemente presentado por las moléculas de HLA-I. Por el contrario, los antígenos con más probabilidad a ser presentados en el contexto de clase II serían antígenos sobreexpresados. Los LT CD8⁺ probablemente reconozcan con mayor afinidad neoantígenos que péptidos propios, debido a que la selección tímica supuestamente ha eliminado los clones que reconocen p-MHC propios con alta afinidad. Sin embargo, se ha demostrado en ratón que los LT CD8⁺ de baja afinidad son capaces de generar una respuesta anti-tumoral solamente si existe una copresencia de LT CD4⁺⁴¹⁴. No obstante, la presentación de cualquier tipo de antígeno siempre estará en último lugar restringida al haplotipo del individuo.

De nuestros resultados se puede concluir que la respuesta T CD4⁺ es más homogénea entre individuos, mientras que la respuesta CD8⁺ parece más limitada a aquellos tumores más inmunogénicos como son los TN en el caso del CM. Por ello, los tratamientos personalizados, es decir, en presencia de neoantígenos identificados, un tratamiento basado en la respuesta de CTL sea probablemente la mejor estrategia. En su lugar, ante el desconocimiento de antígenos diana específicos de tumor (TSA), la estimulación de los LT CD4⁺ puede ser mejor opción. Asimismo, la orquestación y mantenimiento de la respuesta T y, en concreto, la generación de memoria inmunológica ha demostrado ser dependiente de la correcta activación de los LT CD4⁺^{415,416}. En conjunto, esto indica que la presencia de estas células es necesaria, especialmente ante la ausencia de TSA.

Conclusiones

Las conclusiones de este trabajo, en relación con los objetivos inicialmente propuestos, han sido las siguientes:

Objetivo 1. Caracterizar los T-TIL en tumores de cáncer de mama a partir de cultivos iniciales para identificar qué parámetros son definitorios de respuesta CD4+ y CD8+.

- i. Existe una alta heterogeneidad en la frecuencia de las poblaciones de T-TIL CD4+ y CD8+ en las secciones de una misma biopsia y entre biopsias, sin asociación al tipo de tumor.
- ii. Una mayor frecuencia de T-TIL CD4+ no favorece a la generación de un ambiente citotóxico. En cuanto a los T-TIL CD8+ se observó una relación inversa con la secreción de IL-17.
- iii. La presencia de T-TIL CD4+ en mayor porcentaje se correlacionó con una menor diversidad en el repertorio de TCR.
- iv. Las ratios CD8+/CD4+ en cultivo no se correlacionaron con ninguna de los parámetros estudiados.

Objetivo 2. Estudiar las diferencias del repertorio de TCR, así como sus propiedades fisicoquímicas entre T-TIL CD4+ y CD8+ expandidos y purificados.

- i. Las secuencias TRB de los LT CD8+ mostraron un menor tamaño de la región NDNnt en el infiltrado tumoral y un mayor uso de aminoácidos con carga negativa en la región 5-mer central del CDR3aa tanto en el infiltrado como en la periferia.
- ii. Los T-TIL CD4+ manifestaron una menor diversidad que los T-TIL CD8+ y no está relacionada con una mayor convergencia ni expansión de secuencias públicas.
- iii. Las secuencias CDR3aa TRB de los T-TIL CD4+ presentan una mayor intra e intersimilitud, demostrado por la presencia de más motivos formados por muchas más secuencias.
- iv. Los T-TIL CD8+ son más diversos y divergentes en cuanto a los TCR que presentan, tanto entre biopsias como en una misma biopsia.
- v. Una mayor similitud de secuencias CDR3 TRB en los T-TIL CD8+ se detectó en las biopsias TN en comparación con las de tipo luminal.

Conclusiones

Objetivo 3. Describir las diferencias del inmunopeptidoma presentado por células dendríticas con distintos alelos de HLA-DR pulsadas con un mismo extracto tumoral.

Del análisis preliminar se han extraído las siguientes conclusiones:

- i. Una baja homogeneidad en el conjunto de proteínas de las que deriva el peptidoma presentado por distintos alelos.
- ii. Las proteínas más abundantes en el proteoma del extracto de las MCF-7 no eran las más abundantes en el peptidoma presentado.
- iii. La combinación de alelos añade complejidad determinando que el estudio del peptidoma presentado debe realizarse considerando las parejas alélicas.

Objetivo 4. Definir una estrategia para el estudio del papel de los B-TIL a partir del uso de linfomas B derivados de xenoinjertos y monitorizar la respuesta de los T-TIL en presencia de LB EBV+ como APC.

- i. Los B-TIL EBV+ forman parte del infiltrado tumoral.
- ii. Las células XAL-LCL son capaces de estimular y mantener ciertos clones de T-TIL.
- iii. Mediante el análisis del repertorio de TCR se puede monitorizar el efecto de las células XAL-LCL en los T-TIL.
- iv. Las células XAL-LCL presentan péptidos por moléculas de HLA-I y HLA-DR pocos comunes en LCL, considerando la literatura.
- v. Los tumores XAL generados en PDX sirven como modelo para estudiar el papel de los LB EBV+ infiltrantes de tumor.

Anexos

A1. Tablas suplementarias capítulo I

Tabla suplementaria 1. Concentraciones en pg/ml de las citocinas analizadas secretadas en el sobrenadante de los cultivos iniciales de T-TIL. Se muestran las distintas secciones de biopsia puestas en cultivo. así como los días de recogida del sobrenadante.

Biopsia y sección	Día cultivo	IL-4	IL-10	IL-17A	TNF- α	sFas	sFasL	IFN- γ	Granzima A	Granzima B	Perforina	Granulisisina
562.2	5	0	1.34	0	0	0	0	0	0	0	0	0
562.4	5	0	14.71	0	0	32.62	0	0	5.73	0	0	0
562.6	5	0	10.02	0	0	0	0	0	5.44	0	0	0
562.7	5	0	17.93	0	0	0	0	0	20.9	0	0	0
562.9	5	0	16.71	0	0	0	0	0	2.94	0	0	0
562.10	5	0	43.55	13.63	1.87	0	0	0	34.59	0	0	0
562.11	5	0	64.51	21.28	38.14	0	0	0	65.6	8.73	0	0
562.2	10	0	21.31	22.36	6.99	0	0	101	167	2097.78	0	0
562.4	10	0	51.44	67.33	3.31	0	12.35	60.09	388.42	6317.6	0	0
562.6	10	0	83.35	2.33	0	0	0	0	77.79	0	0	0
562.7	10	7.82	115.14	209.85	0	0	0	10.75	2394.83	776.45	0	0
562.9	10	2.18	58.39	4.01	5.11	0	0	0	156.95	0	0	0
562.10	10	0	74.76	20.6	33.92	0	0	0	170.21	0	0	0
562.11	10	0	117.34	56.71	81.62	0	0	0	228.74	12.81	0	0
562.2	14	3.64	21.6	650.1	49.97	17.23	136.87	3945.46	9037.62	27202.86	1337.9	36782.49
562.4	14	0	134.02	644.58	35.74	12.43	166.48	1982.79	8720.88	27436.95	4693.88	5473.86
562.6	14	5.22	803.33	818.95	18.28	263.63	383.79	3024.96	12647.65	45844.81	39104.83	122560.3
562.7	14	4.05	1574.27	1040.41	0	69.87	6.47	60.08	11290.27	6101.78	2390.2	16920.09

Anexos. Capítulo I

Biopsia y sección	Día cultivo	IL-4	IL-10	IL-17A	TNF-α	sFas	sFasL	IFN-γ	Granzima A	Granzima B	Perforina	Granulisina
562.9	14	18.81	67.09	149.39	0	0	14.52	97.32	897.19	810.09	0	0
562.10	14	69.85	212.82	307.6	0	0	5.85	13.5	2572.39	633.64	0	628.51
562.11	14	31.96	56.2	450.14	1.53	121.4	42.69	788.57	4976.78	12621.84	0	1125.32
562.2	20	18.85	31945.24	946.5	134.98	342.6	489.1	14502.68	12647.65	45845.11	39104.83	122560.3
562.4	20	0.69	32.09	745.76	108.07	0	262.02	5440.82	12647.65	37349.5	39104.83	122560.3
562.6	20	18.56	31945.24	991.17	153.1	649.54	1015.18	12738.93	12647.65	45845.14	39104.83	122560.3
562.7	20	7.64	1746.14	996.55	4.3	170.22	17.71	202.74	5081.86	10643.15	3847.4	104363.79
562.9	20	30.88	161.69	544.64	0	94.1	23.07	129.58	9179.31	6466	4112.48	12935.32
562.10	20	23.72	291.28	633.43	0	0	6.39	0	12647.6	1711.24	1649.74	2308.83
562.11	20	19.95	2416.15	827.83	10.74	196.65	120.43	834.45	12647.65	45844.89	7458.06	122560.3
Q1.1D	5	2.38	18.24	6.22	1.37	219.49	4.28	28.07	21.6	41.32	813.71	0
Q1.1B	5	3.62	14.31	11.6	2.5	590.08	6.19	30.75	34.12	49.28	1594	49.25
Q1.3D	5	6.32	19.23	42.04	1.97	100.19	5.86	48.46	164.18	51.35	1107	79.4
Q1.3B	5	11	31.05	84.48	6.04	130.91	7.02	182.99	469.07	89.72	1626	105.93
Q1.4D	5	2.56	11.51	8.79	4.06	41.35	2.52	23.49	23.63	23.76	214.54	0
Q1.4B	5	1.98	7.31	7.07	1.11	49.27	2.27	20.39	34.09	25.62	315.37	0
Q1.6D	5	3.37	21.79	20.21	2.05	169.53	4.42	119.38	82.51	40.46	888.12	34.65
Q1.6B	5	2.09	15.81	3.5	1.1	183.01	2.37	13.6	27.56	30.78	559.73	0
Q1.8D	5	3.08	27.09	16.12	1.71	180.5	3.83	30.89	66.89	37.84	817.22	23.49
Q1.9D	5	1.58	33.58	5.56	1.54	49.78	1.95	13.15	p	21.78	291.55	0

Biopsia y sección	Día cultivo	IL-4	IL-10	IL-17A	TNF- α	sFas	sFasL	IFN- γ	Granzima A	Granzima B	Perforina	Granulislina
Q1.1D	11	1.75	9.07	7.32	0	234.76	2.6	14.77	34.92	26.44	441.68	22.9
Q1.1B	11	2.85	4.79	22.76	0	477.65	2.73	10.06	55.88	26.41	390.41	20.79
Q1.3D	11	31.03	25.88	232.35	6.53	198.06	44.61	133.79	13780	138.45	11690	39262
Q1.3B	11	28.27	18.37	207.78	5.97	185.03	28.65	124.01	13780	134.38	11690	65769
Q1.4D	11	23.41	45.02	109.53	1.47	123.35	17.97	59.81	604.41	62.41	2961	1100
Q1.4B	11	49.49	23.38	204.39	6.62	211.29	30.38	349.05	3452	211.82	4472	1954
Q1.6D	11	15.8	11.7	138.39	2.11	149.78	15.04	77.6	856.08	40.09	6157	1029
Q1.6B	11	15.23	9.96	33.86	0	241.69	4.89	52.06	121.58	26.94	561.85	57.62
Q1.8D	11	19.68	163.95	157.38	3.05	309.3	22.69	90.32	860.3	338.17	8018	1733
Q1.9D	11	14.89	201.74	116.32	2.38	342.65	21.98	89.17	621.3	110.43	7506	1031
Q1.1D	14	1.21	4.22	2.33	0	44.53	1.27	9	32.33	0	183.49	33.03
Q1.3D	14	42.77	27.02	277.78	13.41	219.63	49.68	207.97	13780	126.33	11690	65769
Q1.4D	14	35.73	81.39	137.06	19.6	118.6	41.24	192.17	9701	83.09	11690	11089
Q1.6D	14	41.11	117.18	161.8	24.29	154.6	50.29	236.36	13780	84.64	11690	9368
Q1.8D	14	63.06	251.32	205.74	41.99	242.92	72.58	327.67	13780	119.92	11690	35083
Q1.9D	14	57.65	227.7	186.74	38.1	234.02	68.2	285.19	13780	110.62	11690	24653
Q1.1B	14	2.11	6.73	8.68	1.97	553.9	4.32	20.54	28.37	42.52	924.04	81.92
Q1.3B	14	21.5	11.73	167.44	4.64	62.53	14.74	59.27	13780	39.62	11690	65769
Q1.4B	14	55.95	209.69	180.65	33.14	253.66	72.36	360.91	13780	124.15	11690	65769
Q1.6B	14	36.93	127.04	153.65	21.66	108.32	45.13	205.55	4503	94.03	11690	8196
Q1.1D	20	7.96	11.87	86.11	1.63	269.9	12.65	45.34	271.24	41.5	1303	483.84

Anexos. Capítulo I

Biopsia y sección	Día cultivo	IL-4	IL-10	IL-17A	TNF- α	sFas	sFasL	IFN- γ	Granzima A	Granzima B	Perforina	Granulicina
Q1.1B	20	1.68	6.7	3.79	0	401.05	2.23	11.49	30.06	28.38	386.98	41.15
Q1.3D	20	49.42	127.48	42.5	13.97	299.29	50.34	268.08	13780	176.94	11690	65769
Q1.3B	20	24.26	20.72	149.5	3.13	192.05	21.25	45.71	2870	59.85	11690	48902
Q1.4D	20	25.72	21.22	156.37	3.46	198.56	21.38	43.3	3097	59.72	11690	63375
Q1.4B	20	47.61	28.84	291.93	32.94	136.92	102.6	1094	13780	910.37	11690	65769
Q1.6D	20	36.94	41.45	226.54	8.41	209.04	25.65	148.03	5745	49.78	11690	27853
Q1.6B	20	36.16	20.18	232.28	4.27	415.81	40.38	158.6	12783	77.81	11690	4211
Q1.8D	20	41.89	135.29	244.89	13.21	412.9	49.31	295.09	13780	228.73	11690	65769
Q1.9D	20	46.49	14.71	293.48	20.24	401.78	63.38	528.4	13780	404.91	11690	65769
Q2.2D	5	0	14.91	7.99	0	413.32	11.83	17.74	51.92	382.64	430.01	350.69
Q2.2M	5	0	35.02	15.37	0	222.09	7.57	15.48	111.53	328.38	322.14	306.9
Q2.4D	5	0	13.04	0	0	179.77	0	6.24	12.31	191.66	151.68	154.38
Q2.4M	5	0	4.86	0	0	112.93	0	4.92	5.3	157.89	70.47	70.31
Q2.4B	5	0	14.19	42.36	0	252.99	8.89	26.49	259.79	244.34	384.03	619.32
Q2.6D	5	0	8.36	8.1	0	432.12	4.61	7.36	41.39	229.09	255.61	369.57
Q2.6B	5	0	20.28	28.57	0	44.15	0	18.95	148.05	173.14	119.42	263.12
Q2.8D	5	0	33.01	31.68	0	243.06	0	10.36	152.07	182.31	224.47	67.41
Q2.8B	5	0	11.46	72.78	0	45.41	4.61	35.82	448.91	217.83	210.36	408.2
Q2.9B	5	0	8.1	34.21	0	42.68	2.9	31.72	231.91	239.19	202.84	236.48
Q2.2D	11	0	22.02	68.28	0	245.94	14.69	23.78	505.91	289.14	216.72	493.64

Biopsia y sección	Día cultivo	IL-4	IL-10	IL-17A	TNF- α	sFas	sFasL	IFN- γ	Granzima A	Granzima B	Perforina	Granulisisina
Q2.2M	11	14.18	92.98	307.31	0	155.56	21.68	34.65	2540	423.02	473.47	1645
Q2.4D	11	0	9.54	25.16	0	121.17	4.68	4.49	136.57	126.29	74.15	513.44
Q2.4M	11	0	1.82	17.76	0	158.73	2.6	5.8	101.38	97	41.09	170.81
Q2.4B	11	57.19	22.49	866.25	13.48	273.15	164.73	450.14	3846	9219	6043	18158
Q2.6D	11	0	10.95	57.49	0	476.85	12.48	11.41	363.47	146.31	242.14	1014
Q2.6B	11	44.25	17.72	638.07	5.76	57.83	78.37	418.42	3846	3377	2857	13279
Q2.8D	11	59.3	101.98	627.72	1.66	778.92	37.86	39.41	3846	555.06	5327	6365
Q2.8B	11	80.45	50.54	1187	12.62	198.26	131.69	851.64	3846	12051	6043	20516
Q2.9B	11	94.51	68.22	1315	19.05	279.55	151.52	964.69	3846	12249	6043	20516
Q2.2D	14	109.08	305.05	784.04	90.94	492.82	159.07	571.7	3846	1622	6043	20516
Q2.4D	14	34.12	134.65	646.41	11.43	283.4	97.16	144.81	3846	2617	6043	19847
Q2.6D	14	224.92	663.25	1134	220.03	1267	265.29	592.61	3846	3260	6043	20516
Q2.8D	14	260.02	725.6	1426	250.23	1626	270.55	573.22	3846	2781	6043	20516
Q2.2M	14	167.43	518.47	1110	146.58	1032	242.85	1018	3846	1673	6043	20516
Q2.4M	14	160.73	412.35	1130	126.93	1061	253.95	1119	3846	1897	6043	20516
Q2.4B	14	214	889.69	1393	170.69	1303	333.09	1736	3846	2946	6043	20516
Q2.6B	14	388.45	1904	1515	389.07	2477	439.38	1375	3846	3104	6043	20516
Q2.8B	14	384.81	1525	1369	373.35	1843	421.71	902.26	3846	2230	6043	20516
Q2.9B	14	445.94	1823	1521	441.2	2528	478.45	1054	3846	1967	6043	20516
Q2.2D	20	45.97	17.6	851.06	28.69	429.68	89.39	626.64	3846	10211	6043	17531
Q2.2M	20	89.63	255.55	1447	63.94	361.51	245.68	696.17	3846	19333	6043	20516

Anexos. Capítulo I

Biopsia y sección	Día cultivo	IL-4	IL-10	IL-17A	TNF- α	sFas	sFasL	IFN- γ	Granzima A	Granzima B	Perforina	Granulisina
Q2.4D	20	104.67	16.93	1530	56.44	575.74	345.97	1598	3846	19333	6043	20516
Q2.4M	20	49.1	17.63	932.94	15.68	241.85	82.35	86.22	3846	2236	6043	20516
Q2.4B	20	105.42	453.89	1464	87.25	387.65	191.3	616.39	3846	19333	6043	20516
Q2.6D	20	110.37	1479	1504	60.89	1209	442.33	1558	3846	19333	6043	20516
Q2.6B	20	99.76	833.27	1492	36.24	282.12	160.09	850.66	3846	19333	6043	20516
Q2.8D	20	62.57	16.62	1134	19.14	130.93	59.62	316.86	3846	6854	6043	20516
Q2.8B	20	119.26	5427	1492	186.29	900	469.87	3812	3846	19333	6043	20516
Q2.9B	20	122.88	713.41	1520	219.15	218.5	254.52	3812	3846	19333	6043	20516
Q7.5	5	1.83	12.505	37.59	7.555	58.06	41.88	127.575	5908.685	5451.695	1763.555	2953.59
Q7.6	5	1.2	34.28	48.305	9.415	52.275	64.76	228.38	12734.385	15701.56	2981.105	3090.615
Q7.7	5	0.54	2.67	2.93	0.465	30.67	3.29	13.625	174.495	0	50.93	22.275
Q7.8	5	1.605	12.94	40.11	9.985	46.06	65.9	203.065	11911.91	14519.205	3409.38	6422.465
Q7.5	11	4.075	8.875	52.045	29.48	103.17	309.795	465.01	16600	15230.68	10800	63400
Q7.6	11	3.725	31.4	50.955	27.74	139.755	257.225	412.54	16600	7895.395	10800	63400
Q7.7	11	7.5	3.61	19.265	1.62	74.39	18.07	190.49	1682.55	136.905	269.31	279.49
Q7.8	11	4.445	30.01	59.37	33.495	154.575	419.465	591.235	16600	18323.985	10800	63400
Q7.5	15	0.665	3.98	582.675	8.14	0	528.44	355.75	16600	32240.65	10315.74	63400
Q7.6	15	1.865	87.07	563.135	27.03	79.345	596.555	1196.025	16600	49200	8366.235	63400
Q7.7	15	7.585	2.665	434.64	0	254.04	108.165	339.43	16600	4438.935	989.15	6088.35
Q7.8	15	0	18.485	559.905	8.34	90.42	450.885	310.645	16600	28367.435	8645.835	63400

Biopsia y sección	Día cultivo	IL-4	IL-10	IL-17A	TNF- α	sFas	sFasL	IFN- γ	Granzima A	Granzima B	Perforina	Granulislina
Q7.5	20	0	1.94	481.985	1.38	0	210.955	29.6	16600	12195.32	5098.47	63400
Q7.6	20	0	7.06	518.445	5.79	0	283.675	257.325	16600	20298.915	3478.745	63400
Q7.7	20	0	0.24	355.21	0	0	38.365	63.72	16600	2571.955	435.475	7640.98
Q7.8	20	0	2.515	442.88	1.935	0	227.565	31.74	16600	12893.35	4491.88	63400
Q8.3	5	0	25.515	20.515	0	0	0	32.125	265.795	328.01	0	44.865
Q8.4	5	0	71.67	79.49	0	78.305	0	155.63	1548.6	328.01	42.815	312.93
Q8.5	5	0	49.13	52.615	0	0	0	42.705	903.375	328.01	20.675	219.735
Q8.3	10	2.945	123.085	224.245	0	151.77	11.435	112.23	11100.735	1477	24.59	1439.86
Q8.4	10	0	29.66	154.44	0	255.29	21.66	71.37	7477.675	328.01	206.595	4503.3
Q8.5	10	4.455	35.45	247.97	0	148.03	23.52	55.785	13367.89	4633.365	158.52	6546.63
Q8.3	15	0	65.475	259.14	0	246.645	37.66	80.195	13438.335	2676.28	106.05	7199.725
Q8.4	15	1189.795	11.4	113.135	41.6	171.945	18.83	544.755	3817.685	328.01	124.565	2313.395
Q8.5	15	0	8.88	202.435	0	0	15.43	0	9684.135	328.01	125.1	4755.34
Q8.3	20	0	11.2	178.38	0	245.175	20.24	0	8065.485	1468.76	52.81	3758.86
Q8.4	20	0	6.455	91.86	0	92.715	7.82	0	2793.08	328.01	73.715	820.785
Q8.5	20	0	3.86	148.455	0	148.63	12.55	0	7250.805	328.01	111.425	2229
Q10.1	5	0	0.82	0	0	246.485	0	0	113.39	0	0	0
Q10.2	5	0	1.15	0	0	0	0	0	22.725	0	0	0
Q10.3	5	0	0.81	0	0	0	0	0	99.96	0	0	0
Q10.5	5	0	4.72	31.82	0	0	0	0	585.28	0	60.925	118.985
Q10.1	10	0	1.36	10.17	0	264.34	0	0	401.69	0	0	0

Anexos. Capítulo I

Biopsia y sección	Día cultivo	IL-4	IL-10	IL-17A	TNF- α	sFas	sFasL	IFN- γ	Granzima A	Granzima B	Perforina	Granulisinina
Q10.2	10	0	2.195	0	0	0	0	0	121.04	0	0	0
Q10.3	10	0	0.42	0	0	0	0	0	145.685	0	0	0
Q10.5	10	0	3.64	55.3	0	95.01	7.47	0	1691.035	0	103.85	38.035
Q10.1	15	0	0.745	23.855	0	200.245	0	0	615.895	0	13.635	0
Q10.2	15	0	1.405	0	0	0	0	0	297.87	0	0	0
Q10.3	15	0	0.48	0	0	229.83	0	0	146.16	0	0	0
Q10.5	15	0	1.415	33.275	0	0	3.075	0	854.17	0	54.26	0
Q10.1	20	0	1.09	1.63	0	42.965	6.34	3.64	66	0	51.455	0
Q10.2	20	0	1.04	0	0	29.615	3.59	0	36.025	0	26.635	0
Q10.3	20	0	1.2	0	0	32.19	2.735	0	24.22	0	21.745	0
Q10.5	20	0	2.705	1.86	1.225	36.75	4.84	0	71.25	0	92.345	0
Q12.1	5	1.33	51.995	5.935	2.69	42.345	4.775	37.99	224.69	92.525	98.63	26.575
Q12.2	5	0	14.91	1.34	1.265	25.61	1.715	9.14	18.125	0	62.99	5.35
Q12.3	5	0	4.29	0	0	27.88	1.64	0	9.84	0	11.46	5.64
Q12.4	5	0.73	38.9	1.625	1.51	42.515	2.26	13.03	47.89	27.61	57.045	12.875
Q12.5	5	0	11.405	2.305	0.615	35.85	3.115	11.57	29.145	0	19.275	21.09
Q12.1	10	8.615	83.93	100.71	7.895	66.635	21.385	262.19	5053.985	4351.745	515.44	885.67
Q12.2	10	1.45	41.255	121.3	1.435	35.005	4.485	40.22	696.015	348.645	160.25	109.805
Q12.3	10	0	6.8	3.145	1.015	33.765	2.39	10.375	193.64	49.55	30.73	37.345
Q12.4	10	0.73	29.5	7.1	2.15	32.645	5.915	37.735	335.595	364.985	127.905	222.825

Biopsia y sección	Día cultivo	IL-4	IL-10	IL-17A	TNF- α	sFas	sFasL	IFN- γ	Granzima A	Granzima B	Perforina	Granulisina
Q12.5	10	6.82	11.18	21.85	6.66	66.03	10.975	123.705	1773.88	1513.34	141.345	1518.59
Q12.1	15	2.94	57.665	59.35	13.295	56.865	22.94	173.93	3668.485	387.54	476.02	3126.295
Q12.2	15	1.1	37.02	115.005	1.54	35.965	7.18	46.085	2056.1	278.47	199.4	457.995
Q12.3	15	49.92	8.19	16.47	2.395	37.655	7.56	56.355	1411.555	189.7	107.34	504.865
Q12.4	15	3.685	58.685	32.02	6.92	65.145	23.84	244.69	3287.96	1175.965	416.035	1899.15
Q12.5	15	4.855	36.315	48.14	26.84	92.805	37.355	390.08	16339.025	8217.67	1275.91	17320.675
Q12.1	20	9.67	80.025	52.585	15.035	47.785	32.91	390.315	6666.96	3378.78	375.04	3112.83
Q12.2	20	0.825	27.39	71.22	1.435	41.835	10.95	24.34	2279.275	167.695	279.895	876.355
Q12.3	20	53.825	16.145	47.01	9.2	63.15	24.29	275.52	11297.68	2543.61	616.545	3508.08
Q12.4	20	2.45	21.87	22.825	4.38	51.89	35.215	127.56	2582.21	470.68	501.14	2334.97
Q12.5	20	4.705	30.97	50.535	39.765	97.83	109.68	1459.545	14576.375	12222.27	1569.85	30739.96
Q14.2.1	5	0	3.77	0	0	18.51	2.3	9.495	29.845	28.735	26.84	26.64
Q14.2.2	5	1.675	12.48	6.77	1.935	32.39	5.545	32.99	276.47	129.83	190.78	217.24
Q14.2.3	5	0	2.855	0	0.6	30.31	2.77	2.16	33.21	0	24.665	43.48
Q14.2.4	5	1.975	25.215	8.015	3.225	31.37	3.64	33.505	160.045	58.14	76.555	67.82
Q14.2.1	10	5.475	52.195	33.775	5.95	49.51	41.915	239.4	4204.935	1843.285	961.505	1483.005
Q14.2.2	10	14.53	40.725	50.82	16.165	59.255	77.92	469.005	12604.32	2997.37	3319.18	9876.24
Q14.2.3	10	34.125	13.425	20.95	3.135	46.475	21.67	59.55	1981.75	358.39	416.43	632.465
Q14.2.4	10	5.19	41.94	71.525	12.775	58.405	44.75	546.05	9656.115	3264.045	1872.715	3080.675
Q14.2.1	15	9.715	69.73	46.6	28.92	64.375	181.19	1025.66	14857.125	2265.31	2916.715	9089.93
Q14.2.2	15	5.14	39.84	52.285	33.99	95.155	124.52	849.17	13489.595	2690.295	4481.7	46362.345

Anexos. Capítulo I

Biopsia y sección	Día cultivo	IL-4	IL-10	IL-17A	TNF- α	sFas	sFasL	IFN- γ	Granzima A	Granzima B	Perforina	Granulicina
Q14.2.3	15	4.805	5.115	42.65	15.1	93.735	129.805	176.16	9197.08	1124.05	2612.78	8199.08
Q14.2.4	15	5.125	27.595	70.945	37.095	95.91	156.76	2741.005	14065.755	2120.93	3502.86	32627.035
Q14.2.1	20	16.125	39.55	46.185	40.675	84.225	193.83	1163.065	16233.625	4729.26	3057.815	10193.825
Q14.2.2	20	11.85	35.16	43.495	30.625	71.35	74.795	486.355	8176.415	3847.8	2256.755	25398.87
Q14.2.3	20	10.135	3.53	42.09	18.21	82.19	126.485	238.985	7556.785	1041.72	2940.84	8196.635
Q14.2.4	20	20.57	44.52	66.52	46.01	107.59	148.82	2535.15	12207.065	4975.79	2573.68	34551.005
Q15.2.1	5	1.4	14.995	14.355	2.255	67.055	2.63	40.105	87.98	61.125	40.52	19.87
Q15.2.2	5	1.375	23.88	18.01	3.255	67.665	6.55	38.415	409.325	101.65	63.365	35.03
Q15.2.3	5	1.115	66.32	25.715	3.43	73.725	5.655	65.475	217.67	118.47	106.68	34.77
Q15.2.1	10	1.895	13.49	240.905	11.28	134.065	17.745	183.175	11134	1850.085	833.665	1473.33
Q15.2.2	10	2.12	26.45	275.65	12.22	129.165	22.555	240.585	7361.495	1667.23	939.49	1518.82
Q15.2.3	10	2.145	19.815	307.255	16.925	119.78	22.45	221.515	9932.605	3624.895	949.895	2568.1
Q15.2.1	15	3.665	6.31	164.895	13.045	102.225	18.51	64.195	6914.875	104.765	990.27	3656.68
Q15.2.2	15	2.02	8.815	167.105	12.715	95.71	25.82	111.095	3595.385	149.365	1042.715	2129.11
Q15.2.3	15	1.475	5.89	386.27	32.93	103.33	11.345	88.685	4540.895	182.4	1013.1	3879.07
Q15.2.1	20	4.3	6.575	141.78	11.87	100.895	16.675	27.26	4514.865	98.825	719.11	3263.83
Q15.2.2	20	1.97	8.985	113.215	8.95	76.485	12.975	39.855	1536.095	146.925	513.25	1196.95
Q15.2.3	20	1.535	5.985	575.08	28.355	94.225	9.135	54.455	3676.205	373.06	763.78	2958.78
Q16.1.1	5	2.435	14.55	4.575	3.5	28.835	8.795	46.2	289.07	123.62	246.195	96.565
Q16.2.1	5	1.62	89.815	8.69	2.74	54.39	13.97	26.605	483.96	271.62	984.035	104.25

Biopsia y sección	Día cultivo	IL-4	IL-10	IL-17A	TNF- α	sFas	sFasL	IFN- γ	Granzima A	Granzima B	Perforina	Granulislina
Q16.1.1	10	27.895	8.525	23.62	9.215	43.95	36.595	86.62	2460.72	336.32	1289.655	775.185
Q16.2.1	10	2.64	28.155	25.425	7.34	98.8	78.58	68.82	2655.61	696.69	2600.095	812.71
Q16.1.1	15	26.71	15.485	25.41	8.16	46.075	25.745	75.965	2711.54	341.41	816.485	477.265
Q16.2.1	15	3.47	17.62	13.81	8.595	66.255	38.265	61.13	1204.745	128.375	1346.695	611.755
Q16.1.1	20	8.635	9.99	33.555	5.695	67.695	28.8	64.925	4568.075	295.435	1223.355	700.83
Q16.2.1	20	0.73	6.71	10.69	5.24	109.575	26.545	16.21	807.34	49.07	1219.13	483.915
Q17.3.1	5	0	1.75	0	0	18.415	2.185	0	24.105	0	0	0
Q17.3.2	5	1.715	19.7	3.59	1.885	36.44	2.735	6.595	72.69	31.86	77.735	19.545
Q17.3.3	5	0	5.605	0	0.525	19.155	2.375	4.025	17.17	31.045	20.07	0
Q17.3.5	5	1.91	24.75	13.22	2.72	30.26	5.99	49.63	304.13	40.935	148.665	59.54
Q17.3.1	10	0	4.855	0	0	21.13	1.755	4.34	21.615	0	0	0
Q17.3.2	10	2.47	26.82	52.445	4.645	57.65	8.05	22.825	1405.995	81.055	225.265	289.25
Q17.3.3	10	0.815	6.715	1.77	0.52	31.82	3.3	9.505	44.295	16.325	40.14	12.815
Q17.3.5	10	7.375	36.865	45.255	12.32	60.94	66.3	137.125	9275.285	4637.82	2339.55	5356.01
Q17.3.1	15	0	3.985	0	0	23.53	2.305	7.05	40.58	0	8.28	20.585
Q17.3.2	15	7.775	31.935	125.09	6.625	55.045	15.975	82.315	6319.485	451.14	403.35	1207.12
Q17.3.3	15	1.665	10.315	2.26	1.125	25.68	4.225	18.35	99.72	15.81	47.985	29.71
Q17.3.5	15	17.85	22.96	51.435	32.56	93.805	128.475	392.54	16600	14611.865	6276.065	26440.575
Q17.3.1	20	2.015	5.495	2.405	0.62	73.1	4.67	16.155	77.94	41.7	68.39	70.765
Q17.3.2	20	17.92	34.15	73.945	5.755	56.915	9.295	117.025	3436.69	291.04	210.56	1551.755
Q17.3.3	20	11.18	21.47	13.41	1.72	99.815	13.135	138.175	780.92	107.28	211.885	373.24

Anexos. Capítulo I

Biopsia y sección	Día cultivo	IL-4	IL-10	IL-17A	TNF- α	sFas	sFasL	IFN- γ	Granzima A	Granzima B	Perforina	Granulinsina
Q17.3.5	20	82.555	14	49.54	16.485	46.79	26.16	358	9137.39	3502.305	655.56	4237.015

Tabla suplementaria 2. Valores obtenidos en el análisis de las propiedades de las secuencias de CDR3 de T-TIL iniciales de distintas secciones de cada biopsia⁸.

Biopsia y sección	Número de secuencias CDR3nt		Tamaño CDR3nt		Tamaño N(D)Nnt		Carga CDR3aa		Hidropatía CDR3aa		Polaridad CDR3aa	
	TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB
562.4	3204	1601	39.38	43.81	4.09	13.58	-0.037	0.005	-1.625	-0.289	0.632	0.426
562.6	10046	4317	40.62	43.28	5.02	13.00	-0.002	0.009	-1.167	-0.690	0.577	0.499
562.7	1079	1130	40.04	41.45	2.36	5.49	0.091	0.001	-1.068	-1.649	0.542	0.716
562.11	2085	896	46.03	45.16	6.41	14.41	-0.001	0.040	-0.823	0.080	0.416	0.153
Q1.1B	390	439	42.32	43.60	6.07	16.35	-0.010	-0.003	-0.842	0.182	0.599	0.348
Q1.3D	8	220	41.16	45.10	3.46	15.08	-0.104	-0.004	-1.000	-1.046	0.651	0.485
Q1.4B	589	1025	39.50	51.46	6.31	19.16	0.002	-0.011	-0.885	0.863	0.583	0.219
Q1.8D	86	167	43.26	42.96	1.30	14.11	-0.108	0.000	-2.000	-2.062	0.685	0.865
Q1.9D	287	314	42.08	44.19	5.23	11.15	0.042	0.003	-1.000	-1.408	0.527	0.747
Q2.2M	1931	2827	40.50	43.87	2.49	13.01	0.015	-0.029	0.110	-1.245	0.304	0.461
Q2.8D	1336	1364	41.36	42.26	2.91	12.96	-0.027	-0.002	-1.000	-0.526	0.536	0.353
Q7.5	2666	3119	41.22	44.11	4.87	14.33	-0.039	0.022	-1.000	-0.922	0.596	0.486

⁸ Todas las secuencias CDR3 de las cuales derivan estos valores serán accesibles en un repositorio a partir de su publicación.

Biopsia y sección	Número de secuencias CDR3nt		Tamaño CDR3nt		Tamaño N(D)Nnt		Carga CDR3aa		Hidropatía CDR3aa		Polaridad CDR3aa	
	TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB
Q7.6	3617	4083	39.46	45.39	4.37	15.31	-0.011	0.032	-1.000	-0.712	0.589	0.501
Q7.8	2520	3255	42.86	44.87	4.66	14.69	-0.015	-0.024	-1.000	-0.803	0.616	0.573
Q8.3	731	691	41.42	42.47	5.62	12.98	0.018	-0.127	-1.000	-1.423	0.598	0.629
Q8.4	1560	1795	40.16	43.44	3.66	13.53	0.005	0.021	-1.000	-0.892	0.604	0.537
Q8.5	1028	1095	41.15	43.64	4.58	13.20	0.006	0.004	-1.000	-0.745	0.553	0.512
Q10.1	745	965	45.05	45.54	5.31	15.03	-0.020	0.014	-0.503	-0.170	0.449	0.403
Q10.3	370	532	42.22	44.09	4.98	13.61	0.057	-0.002	-0.975	-0.658	0.551	0.535
Q10.5	1673	1703	41.80	43.67	4.49	13.10	0.065	-0.011	-0.969	-0.723	0.530	0.541
Q12.4	1737	1491	40.55	42.63	5.95	13.83	0.011	0.012	-1.000	-1.251	0.584	0.596
Q15.2.1	118	92	45.51	43.36	5.94	8.18	0.026	-0.120	-1.000	-0.241	0.583	0.447
Q15.2.3	80	407	48.93	43.44	10.13	12.39	0.006	0.024	-0.197	0.277	0.350	0.453
Q16.2.1	1139	1125	41.40	42.07	3.92	16.36	0.161	-0.012	-2.000	-0.257	0.763	0.435
Q17.3.2	568	539	41.53	45.56	3.47	12.36	0.043	-0.012	-1.000	-0.794	0.566	0.639
Q17.3.5	219	165	42.41	42.84	4.94	12.32	0.001	0.071	-1.000	-1.571	0.611	0.659

Tabla suplementaria 3. Valores obtenidos en el análisis de la diversidad y del nivel CR en el repertorio de TCR de T-TIL iniciales de distintas secciones de cada biopsia.

Biopsia y sección	Diversidad (nS-W) ^a		Nivel CR (por sección)	
	TRA	TRB	TRA	TRB
562.4	0,48	0,47	1,40	1,16
562.6	0,59	0,69	1,34	1,16
562.7	0,28	0,12	1,23	1,09
562.11	0,28	0,18	1,26	1,05
Q1.1B	0,11	0,19	1,03	1,03
Q1.3D	0,55	0,18	1,00	1,01
Q1.4B	0,23	0,28	1,02	1,02
Q1.8D	0,22	0,17	1,05	1,01
Q1.9D	0,34	0,30	1,05	1,02
Q2.2M	0,29	0,27	1,03	1,03
Q2.8D	0,34	0,35	1,07	1,04
Q7.5	0,69	0,63	1,10	1,03
Q7.6	0,70	0,70	1,09	1,04
Q7.8	0,59	0,55	1,06	1,04
Q8.3	0,62	0,61	1,05	1,04
Q8.4	0,78	0,77	1,03	1,05
Q8.5	0,72	0,74	1,04	1,04
Q10.1	0,46	0,45	1,09	1,06
Q10.3	0,62	0,64	1,09	1,06
Q10.5	0,62	0,71	1,08	1,04
Q12.4	0,59	0,60	1,08	1,04
Q15.2.1	0,37	0,29	1,07	1,08
Q15.2.3	0,46	0,32	1,00	1,10
Q16.2.1	0,21	0,26	1,05	1,05
Q17.3.2	0,50	0,43	1,02	1,01
Q17.3.5	0,46	0,54	1,01	1,02

^aDiversidad calculada mediante el índice de Shannon-Wiener normalizado.

A2. Tablas suplementarias capítulo II

Tabla suplementaria 4. Valores del análisis de las distintas propiedades del TCR analizadas obtenidos de los T-TIL CD4+ y CD8+ expandidos de distintas secciones de cada biopsia⁹. (A) Número de secuencias CDR3nt TRA y TRB, así como los valores obtenidos de los análisis del tamaño de la región CDR3nt y de la región N(D)Nnt; (B) propiedades bioquímicas de los 5 aminoácidos centrales del CDR3aa (carga, hidropatía y polaridad); (C) diversidad calculada según el índice de Shannon-Wiener normalizado (nS-W) y nivel de convergencia (CR).

A. Número de secuencias, tamaño de las regiones CDR3nt y N(D)Nnt.

Biopsia sección	y	Número de secuencias CDR3nt				Tamaño CDR3nt				Tamaño N(D)Nnt			
		CD4+		CD8+		CD4+		CD8+		CD4+		CD8+	
		TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB
Q1.3D		1625	1552	1296	1308	41.35	44.33	41.10	43.75	3.89	14.00	4.57	12.34
Q1.4B				145	205			39.81	44.58			5.17	12.67
Q1.8D					153				44.50				11.22
Q2.8D				105	149			39.58	40.91			3.92	12.13
Q8.3	68	64	326	261	44.51	36.34	41.39	42.78	3.20	10.16	4.36	12.34	
Q8.4	632	709	534	491	42.05	39.69	40.10	41.96	4.19	11.68	3.51	12.42	
Q8.5	256	297	263	378	39.60	43.95	40.68	42.95	4.67	12.30	4.26	13.71	
Q12.3	332	299	220	220	46.26	47.47	38.97	43.88	8.33	13.18	6.27	11.81	
Q12.5	473	428			41.94	43.04			4.05	14.95			
Q14.2.1	1289	1474	538	532	38.86	42.35	41.27	42.76	3.28	12.42	5.55	13.71	
Q14.2.2	1202	1083			38.60	44.04			4.53	14.67			

⁹ Todas las secuencias CDR3 de las cuales derivan estos valores serán accesibles en un repositorio a partir de su publicación.

Anexos. Capítulo II

Biopsia sección	y	Número de secuencias CDR3nt				Tamaño CDR3nt				Tamaño N(D)Nnt			
		CD4+		CD8+		CD4+		CD8+		CD4+		CD8+	
		TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB
Q14.2.3		560	462			41.90	43.04			6.05	17.72		
Q14.2.4		778	828	280	331	40.32	45.12	39.40	42.68	5.94	11.36	5.68	10.27
Q15.2.1		229	404			45.14	44.03			8.10	11.31		
Q15.2.2		566	508			39.27	43.34			3.51	13.11		
Q15.2.3		80	198			39.04	44.89			5.07	13.31		
Q16.1.1		348	543	1173	945	41.92	42.02	38.37	42.08	3.99	17.61	3.27	12.83
Q16.2.1		320	316	384	376	43.29	42.23	41.22	43.37	4.87	16.57	4.68	11.80
Q17.3.2		16	23	23	53	39.62	41.26	36.18	45.06	9.42	20.89	4.95	9.25
Q17.3.3		37	57	111	88	39.53	42.20	38.05	41.86	9.81	19.94	4.03	9.72
Q17.3.5				62	79			42.60	35.02			4.12	5.04

B. Carga, hidropatía y polaridad de los 5 aminoácidos centrales de la región CDR3aa.

Biopsia sección	y	Carga CDR3aa				Hidropatía CDR3aa				Polaridad CDR3aa			
		CD4+		CD8+		CD4+		CD8+		CD4+		CD8+	
		TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB
Q1.3D		0.02	0.02	-0.01	-0.04	-0.88	-1.26	-1.13	-0.88	0.54	0.62	0.57	0.54
Q1.4B				0.11	-0.01			-1.21	-1.10			0.53	0.58
Q1.8D					0.00				-0.43				0.51
Q2.8D				-0.10	0.07			-1.55	-0.94			0.68	0.43

Biopsia sección	y	Carga CDR3aa				Hidropatía CDR3aa				Polaridad CDR3aa			
		CD4+		CD8+		CD4+		CD8+		CD4+		CD8+	
		TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB
Q8.3		0.00	0.37	-0.01	-0.17	-0.27	-0.84	-1.35	-2.24	0.59	0.59	0.67	0.74
Q8.4		0.00	0.20	-0.01	0.01	-0.81	-0.95	-1.29	-1.03	0.59	0.58	0.62	0.56
Q8.5		0.02	0.00	0.02	0.00	-1.14	-0.32	-1.05	-0.92	0.55	0.48	0.55	0.54
Q12.3		0.04	0.14	0.03	0.00	-1.18	-1.36	-1.16	-1.33	0.58	0.67	0.53	0.63
Q12.5		0.01	-0.05			-1.74	-0.63			0.69	0.34		
Q14.2.1		0.06	0.01	-0.08	-0.07	-1.43	-0.93	-1.20	-0.71	0.60	0.58	0.59	0.45
Q14.2.2		0.03	0.00			-1.06	-0.99			0.57	0.56		
Q14.2.3		-0.12	0.18			-1.46	-0.08			0.55	0.36		
Q14.2.4		0.06	-0.05	-0.04	-0.05	-1.27	-0.38	-1.46	-0.56	0.62	0.48	0.51	0.50
Q15.2.1		0.19	-0.04			-1.82	-2.22			0.59	0.61		
Q15.2.2		-0.13	-0.01			-1.48	-0.86			0.65	0.58		
Q15.2.3		-0.01	-0.07			-1.79	-0.68			0.63	0.53		
Q16.1.1		0.19	0.00	-0.01	-0.03	-1.54	-0.10	-1.59	-0.55	0.79	0.40	0.62	0.56
Q16.2.1		0.12	-0.02	-0.06	-0.14	-1.44	-0.27	-1.30	-1.25	0.74	0.42	0.66	0.63
Q17.3.2		-0.03	0.14	0.19	0.00	-0.44	-2.25	-0.51	-0.71	0.63	0.88	0.40	0.79
Q17.3.3		-0.03	0.12	0.13	0.00	-0.42	-2.04	-0.58	-0.70	0.63	0.84	0.46	0.58
Q17.3.5				-0.12	-0.12			-1.49	-1.12			0.60	0.79

C. Diversidad y nivel de convergencia (CR).

Biopsia y sección	Diversidad (nS-W) ^a				Nivel CR (por sección)			
	CD4+		CD8+		CD4+		CD8+	
	TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB	TRA	TRB
Q1.3D	0,74	0,68	0,77	0,78	1,10	1,04	1,09	1,06
Q1.4B			0,61	0,58			1,08	1,08
Q1.8D				0,46				1,04
Q2.8D			0,53	0,54			1,07	1,08
Q8.3	0,14	0,09	0,51	0,46	1,05	1,02	1,04	1,13
Q8.4	0,61	0,53	0,66	0,68	1,03	1,05	1,05	1,04
Q8.5	0,70	0,68	0,73	0,71	1,02	1,05	1,03	1,02
Q12.3	0,28	0,33	0,42	0,51	1,06	1,14	1,03	1,11
Q12.5	0,47	0,28			1,04	1,15		
Q14.2.1	0,64	0,68	0,70	0,70	1,03	1,13	1,03	1,14
Q14.2.2	0,61	0,65			1,03	1,12		
Q14.2.3	0,21	0,22			1,05	1,11		
Q14.2.4	0,40	0,35	0,55	0,53	1,09	1,03	1,05	1,08
Q15.2.1	0,06	0,12			1,05	1,10		
Q15.2.2	0,51	0,59			1,03	1,14		
Q15.2.3	0,62	0,54			1,01	1,11		
Q16.1.1	0,06	0,07	0,57	0,50	1,05	1,03	1,10	1,04
Q16.2.1	0,17	0,22	0,64	0,60	1,03	1,08	1,05	1,10
Q17.3.2	0,25	0,23	0,07	0,09	1,00	1,00	1,00	1,04
Q17.3.3	0,17	0,21	0,18	0,21	1,00	1,12	1,05	1,08
Q17.3.5			0,34	0,24			1,00	1,03

^aDiversidad calculada mediante el índice de Shannon-Wiener normalizado.

A3. Tablas suplementarias capítulo III

Tabla suplementaria 5. Péptidos asociados a las moléculas de HLA-DR en las muestras DC19.

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad											
			PSM	MCF-7										
				1	2	3	7	12	14	21	22			
SGTDFTLTISRLEPED	1 A0A0C4DH25	Immunoglobulin kappa variable 3D-20					SB							
FPPSSEELQANKATLV	6 A0M8Q6	Immunoglobulin lambda constant 7						W						W
FPPSSEELQANKATLV	6 A0M8Q6	Immunoglobulin lambda constant 7					W	W						W
FPPSSEELQANKATLV	6 A0M8Q6	Immunoglobulin lambda constant 7					B	B						B
FPPSSEELQANKATLV	6 A0M8Q6	Immunoglobulin lambda constant 7						W	W					W
GHSMVSVSTPISE	1 A6NCE7	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3 beta 2					SB							B
ARVTNQYNNPAG	1 O00151	PDZ and LIM domain protein 1	2	3			SB							
ILGGLYPSKILLSGT	1 O00182	Galectin-9					SB	SB						
ILGGLYPSKILLSGT	1 O00182	Galectin-9						W	W					
EQQLAVQQVEEAQQ	2 O00461	Golgi integral membrane protein 4					W							
QQRLAVQQVEEAQQ	1 O00461	Golgi integral membrane protein 4					SB							
IESTFDVSSKPVGGQ	3 O00462	Beta-mannosidase						SB	SB					SB
IESTFDVSSKPVG	3 O00462	Beta-mannosidase						SB	SB					SB
IESTFDVSSKPVGGQ	3 O00462	Beta-mannosidase						SB	SB					SB
IESTFDVSSKPVG	3 O00462	Beta-mannosidase						SB	SB					SB
IESTFDVSSKPVGGQ	3 O00462	Beta-mannosidase						W	W					W
IESTFDVSSKPVG	3 O00462	Beta-mannosidase						B	B					B
IESTFDVSSKPVG	3 O00462	Beta-mannosidase						W	W					W
IESTFDVSSKPVG	3 O00462	Beta-mannosidase						B	B					B
LNEEEIRANVAVVSGAPL	1 O00560	Syntenin-1						W	W					W
LNEEEIRANVAVVSGAPL	2 O00560	Syntenin-1						B	B					B
NEEEIRANVAVVSGAP	5 O00560	Syntenin-1						W	W	W	W			W
NEEEIRANVAVVSGAP	5 O00560	Syntenin-1						B	B	B	B			B
LNEEEIRANVAVVSGAPL	1 O00560	Syntenin-1						SB	SB					SB
LNEEEIRANVAVVSGAPL	2 O00560	Syntenin-1						SB	SB					SB
NEEEIRANVAVVSGAP	5 O00560	Syntenin-1						SB	SB	SB	SB			SB
NEEEIRANVAVVSGAP	5 O00560	Syntenin-1						SB	SB	SB	SB			SB
VQLVQANSPASLVGLR	2 O00560	Syntenin-1												W
VQLVQANSPASLVGLR	2 O00560	Syntenin-1												B
NEEEIRANVAVVSG	3 O00560	Syntenin-1						SB	SB		SB			SB
NEEEIRANVAVVSG	3 O00560	Syntenin-1						SB	SB		SB			SB
NEEEIRANVAVVSGAP	5 O00560	Syntenin-1						W	W	W	W			W
NEEEIRANVAVVSGAP	5 O00560	Syntenin-1						B	B	B	B			B
ITSIVKDSSAARNGLL	1 O00560	Syntenin-1						SB						
LNEEEIRANVAVVSGAPL	1 O00560	Syntenin-1						W	W					W
LNEEEIRANVAVVSGAPL	2 O00560	Syntenin-1						B	B					B
EEEIRANVAVVSGAPL	3 O00560	Syntenin-1						W	W					
EEEIRANVAVVSGAPL	3 O00560	Syntenin-1						B	B					
EEEIRANVAVVSGAPLQ	3 O00560	Syntenin-1						W	W	W				
EEEIRANVAVVSGAPLQ	3 O00560	Syntenin-1						B	B	B				
NEEEIRANVAVVSGAP	5 O00560	Syntenin-1						W	W	W	W			W
NEEEIRANVAVVSGAP	5 O00560	Syntenin-1						B	B	B	B			B
NEEEIRANVAVVSGAPL	3 O00560	Syntenin-1						W	W					
NEEEIRANVAVVSGAPL	3 O00560	Syntenin-1						B	B					
SLNEEEIRANVAVVSGAP	1 O00560	Syntenin-1						W						
SLNEEEIRANVAVVSGAP	1 O00560	Syntenin-1						B						

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad														
			PSM	MCF-7													
				1	2	3	7	12	14	21	22						
Peptid PSM	DR*03:01	DR*13:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01		
LNEEEIRANVAVVSGAPL	1	O00560	Syntenin-1	W	W									W	W		
	2			B	B									B	B		
EEEIRANVAVVSGAPL	3	O00560	Syntenin-1	W	W												
				B	B												
EEEIRANVAVVSGAPLQ	3	O00560	Syntenin-1	W	W	W											
				B	B	B											
NEEEIRANVAVVSGAPL	3	O00560	Syntenin-1	W	W												
				B	B												
EEEIRANVAVVSGAPLQ	3	O00560	Syntenin-1	W	W	W											
				B	B	B											
NEEEIRANVAVVSGAP	5	O00560	Syntenin-1	W	W		W	W	W	W				W	W		
				B	B		B	B	B	B				B	B		
VDKVIQAQTAFSANPA	4	O00560	Syntenin-1				SB	SB				SB	SB				
NPANPAILSEASAPIPH	4	O00560	Syntenin-1				W	W				W	W				
							B	B				B	B				
VDKVIQAQTAFSAN	1	O00560	Syntenin-1				SB										
NPANPAILSEASAPIPHD	3	O00560	Syntenin-1				W	W				W	W				
							B	B				B	B				
NEEEIRANVAVVSG	3	O00560	Syntenin-1				W	W	W					W			
							B	B	B					B			
NEEEIRANVAVVSGAP	5	O00560	Syntenin-1	SB	SB		SB	SB	SB	SB				SB	SB		
VDKVIQAQTAFSANPA	4	O00560	Syntenin-1				W	W				W	W				
							B	B				B	B				
NPANPAILSEASAPIPH	4	O00560	Syntenin-1				W	W				W	W				
							B	B				B	B				
NPANPAILSEASAPIPHD	3	O00560	Syntenin-1				W	W				W	W				
							B	B				B	B				
NEEEIRANVAVVSG	3	O00560	Syntenin-1				SB	SB		SB					SB		
NEEEIRANVAVVSGAP	5	O00560	Syntenin-1	W	W		W	W	W	W				W	W		
				B	B		B	B	B	B				B	B		
LNEEEIRANVAVVSGAP	2	O00560	Syntenin-1						W	W							
									B	B							
NEEEIRANVAVVSGAP	5	O00560	Syntenin-1	SB	SB		SB	SB	SB	SB				SB	SB		
NEEEIRANVAVVSG	3	O00560	Syntenin-1				SB	SB		SB					SB		
LNEEEIRANVAVVSGAP	2	O00560	Syntenin-1						SB	SB							
NEEEIRANVAVVS	1	O00560	Syntenin-1						SB								
VDKVIQAQTAFSANPA	4	O00560	Syntenin-1				SB	SB				SB	SB				
NPANPAILSEASAPIPH	4	O00560	Syntenin-1				SB	SB				SB	SB				
NPANPAILSEASAPIPHD	3	O00560	Syntenin-1				SB	SB				SB	SB				
VDKVIQAQTAFSANPANPA	3	O00560	Syntenin-1									SB					
VDKVIQAQTAFSANPAN	2	O00560	Syntenin-1									SB					
NPANPAILSEASAPIPHDG	1	O00560	Syntenin-1									SB	SB				
KVIQAQTAFSANPANPA	1	O00560	Syntenin-1									SB					

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad													
				Peptid PSM	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad												
					1	2	3	7	12	14	21	22					
VDKVIQAQTAFSANPA	4 O00560	Syntenin-1		DR*0301	DR*1301	DR*1305	DR*1501	DR*0404	DR*1302	DR*0701	DR*1302	DR*0301	DR*1303	DR*0102	DR*1302	DR*1301	DR*0701
								W B	W B			W B	W B				
NPANPAILSEASAPIPH	4 O00560	Syntenin-1						W B	W B			W B	W B				
NPANPAILSEASAPIPHD	3 O00560	Syntenin-1						W B	W B			W B	W B				
NPANPAILSEASAPIPHDG	1 O00560	Syntenin-1										W B	W B				
NTRIYITDGNMQLTV	1 O00754	Lysosomal alpha-mannosidase															W B
NTRIYITDGNMQLT	1 O00754	Lysosomal alpha-mannosidase															W B
VPSDVVIFPSSDSQAHP	8 O00754	Lysosomal alpha-mannosidase				SB	SB										
VPSDVVIFPSSDSQAHP	8 O00754	Lysosomal alpha-mannosidase				SB	SB										
VPSDVVIFPSSDSQAHPPE	3 O00754	Lysosomal alpha-mannosidase					SB										
DVVIFPSSDSQAHPPE	1 O00754	Lysosomal alpha-mannosidase					SB										
DVVIFPSSDSQAHP	1 O00754	Lysosomal alpha-mannosidase					SB										
TVPSDVVIFPSSDSQAHP	1 O00754	Lysosomal alpha-mannosidase					SB										
SDVVIFPSSDSQAHP	2 O00754	Lysosomal alpha-mannosidase					SB										
IRATFDPDITGLLME	2 O00754	Lysosomal alpha-mannosidase										W B					
IRATFDPDITGLLMEIM	1 O00754	Lysosomal alpha-mannosidase										W B					
DGNFIYSQADENQKG	2 O14786	Neuropilin-1					SB										
GNFIYSQADENQKG	2 O14786	Neuropilin-1					SB										
GNFIYSQADENQK	2 O14786	Neuropilin-1					SB										
DGNFIYSQADENQK	1 O14786	Neuropilin-1					SB										
GNILNEKNSVAS	1 O15204	ADAM DEC1					SB										
SPQSFFDITTPSGRIL	1 O15438	Canalicular multispecific organic anion transporter 2									SB						
SDRSIYILDPLSALD	1 O15440	Multidrug resistance-associated protein 5					SB										
ANMVGLANLHAMG	1 O43395	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp3					SB										
VPLLATESVKQEEAG	2 O43493	Trans-Golgi network integral membrane protein 2	4	7				W B									
VPLLATESVKQEEA	2 O43493	Trans-Golgi network integral membrane protein 2	4	7				W B									
GADLLSINSAELTYLK	2 O60449	Lymphocyte antigen 75															W B
EIAIDDIRISTDVPLE	2 O60462	Neuropilin-2						W B	W B								W B

Secuencia	Identificador	Descripción	PSM	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad												
					1	2	3	7	12	14	21	22					
AIDDIRISTDVPLEN	2 O60462	Neuropilin-2							SB	SB							SB
AIDDIRISTDVPLE	3 O60462	Neuropilin-2							SB	SB							SB
EIAIDDIRISTDVPLE	2 O60462	Neuropilin-2							W	W							W
									B	B							B
AIDDIRISTDVPLEN	2 O60462	Neuropilin-2							SB	SB							SB
AIDDIRISTDVPLE	3 O60462	Neuropilin-2							SB	SB							SB
EIAIDDIRISTDVPLEN	1 O60462	Neuropilin-2							SB	SB							
IDDIRISTDVPLE	2 O60462	Neuropilin-2							SB	SB							
IAIDDIRISTDVPLE	2 O60462	Neuropilin-2							SB	SB							
SGEIAIDDIRISTDVPLE	1 O60462	Neuropilin-2							W								
									B								
EIAIDDIRISTDVPLE	2 O60462	Neuropilin-2							W	W							W
									B	B							B
AIDDIRISTDVPLEN	2 O60462	Neuropilin-2							SB	SB							SB
AIDDIRISTDVPLE	3 O60462	Neuropilin-2							W	W							W
									B	B							B
EIAIDDIRISTDVPLEN	1 O60462	Neuropilin-2							W	W							
									B	B							
IDDIRISTDVPLE	2 O60462	Neuropilin-2							W	W							
									B	B							
IAIDDIRISTDVPLE	2 O60462	Neuropilin-2							W	W							
									B	B							
AQRISINSISA	1 O60701	UDP-glucose 6-dehydrogenase		1	64				W								
				4					B								
AQRISINSISAL	1 O60701	UDP-glucose 6-dehydrogenase		1	64				SB								
				4													
DGQIYYDGKTGEKV	2 O75083	WD repeat-containing protein 1		5	12						W	W					
											B	B					
SADGQIYYDGKTGEKV	1 O75083	WD repeat-containing protein 1		5	12						W	W					
											B	B					
DGQIYYDGKTGEKV	2 O75083	WD repeat-containing protein 1		5	12						SB	SB					
SADGQIYYDGKTGEKV	1 O75083	WD repeat-containing protein 1		5	12						SB	SB					
GAGGASILATAANLLR	2 O75204	Transmembrane protein 127							SB	SB							
GASILATAANLLR	1 O75204	Transmembrane protein 127							SB	SB							
AGGASILATAANLLR	1 O75204	Transmembrane protein 127							SB	SB							
GAGGASILATAANLLR	2 O75204	Transmembrane protein 127							W	W							
									B	B							
GASILATAANLLR	1 O75204	Transmembrane protein 127							SB	SB							
AGGASILATAANLLR	1 O75204	Transmembrane protein 127							W	W							
									B	B							
WGALATISTLEAVRG	6 O75629	Protein CREG1							SB								
WGALATISTLEAVR	3 O75629	Protein CREG1							SB								
DWGALATISTLEAVR	1 O75629	Protein CREG1							SB								
DWGALATISTLEAVRG	1 O75629	Protein CREG1							SB								

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad															
				1	2	3	7	12	14	21	22								
	PSM		Péptid PSM	DR*0301	DR*1301	DR*1305	DR*1501	DR*0404	DR*1302	DR*0701	DR*1302	DR*0301	DR*1303	DR*0102	DR*1302	DR*1301	DR*1302	DR*0701	
GDKKEIQNMDDNIDET	2 O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	1 1					SB											
GDKKEIQNMDDNIDET	2 O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	1 1					SB											
GDKKEIQNMDDNIDE	1 O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	1 1					SB											
GNAVVELVTVKSFDT	1 O75787	Renin receptor						SB											
SLPLNSLSRNNEVDL	2 O75787	Renin receptor																	SB
LPLNSLSRNNEVDL	1 O75787	Renin receptor																	W B
EEIEVMAKSIDFPL	2 O75844	CAAX prenyl protease 1 homolog																	SB
EEIEVMAKSIDFPL	1 O75844	CAAX prenyl protease 1 homolog																	SB
EAEATSVNSLGSQK	1 O94919	Endonuclease domain-containing 1 protein																	SB
ENDNTVLLDPPLIALDKDA PL	2 O94985	Calsyntenin-1		W B															W B
ENDNTVLLDPPLIALDKDA PL	2 O94985	Calsyntenin-1		W B															W B
VGVEFEASTRMQDTSVS	2 O96008	Mitochondrial import receptor subunit T																	SB
VEFEASTRMQDTSVS	1 O96008	Mitochondrial import receptor subunit T																	SB
VEFEASTRMQDTS	1 O96008	Mitochondrial import receptor subunit T																	SB
LQEFLNVTSVHL	2 P00488	Coagulation factor XIII A chain																	W B
QDQVTVAMTPRSEG	1 P00734	Prothrombin																	SB
GQPSVLQVVNLPIVERPV	2 P00734	Prothrombin																	W B
GQPSVLQVVNLPIVERP	1 P00734	Prothrombin																	W B B
GQPSVLQVVNLPIVERP	1 P00734	Prothrombin																	W B B
LPNGDFRYTTTIMGVNT	3 P00736	Complement C1r subcomponent																	SB SB
LPNGDFRYTTTIMGVNT	3 P00736	Complement C1r subcomponent																	SB SB
GDFRYTTTIMGVNTY	2 P00736	Complement C1r subcomponent																	SB SB
LPNGDFRYTTTIMGVNT	3 P00736	Complement C1r subcomponent																	W B B
GDFRYTTTIMGVNTY	2 P00736	Complement C1r subcomponent																	W B B
DQLQIYANGKNIG	1 P00736	Complement C1r subcomponent																	W B
DGQSYRGTSSTTTTG	1 P00747	Plasminogen																	SB
AVLTIDEKGTAAAGAM	3 P01009	Alpha-1-antitrypsin																	SB SB
KAVLTIDEKGTAA	2 P01009	Alpha-1-antitrypsin																	SB

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad											
			PSM	MCF-7										
					1	2	3	7	12	14	21	22		
Péptid PSM	DR*03:01	DR*03:05	DR*05:01	DR*04:04	DR*03:02	DR*07:01	DR*03:02	DR*03:01	DR*03:03	DR*01:02	DR*03:02	DR*03:01	DR*03:02	DR*07:01
KAVLTIDEKGTAAAG	1 P01009	Alpha-1-antitrypsin	SB											
AVLTIDEKGTAAAG	1 P01009	Alpha-1-antitrypsin	SB											
FNKITPNLAEFASF	2 P01009	Alpha-1-antitrypsin					W B							
AVLTIDEKGTAAAGAM	3 P01009	Alpha-1-antitrypsin	SB						SB	SB				
AVLTIDEKGTAAAGAM	3 P01009	Alpha-1-antitrypsin	SB						SB	SB				
GNRIAQWQSFQLEGGL	4 P01023	Alpha-2-macroglobulin			W B								W B	W B
GNRIAQWQSFQLEGG	4 P01023	Alpha-2-macroglobulin			SB								SB	SB
EDSLVFVQTDKSIYKPG	1 7 P01023	Alpha-2-macroglobulin		W B	W B	W B	W B						W B	
GNRIAQWQSFQLEGGL	4 P01023	Alpha-2-macroglobulin			W B								W B	W B
GNRIAQWQSFQLEGG	4 P01023	Alpha-2-macroglobulin			W B								W B	W B
DSLVFVQTDKSIYKP	5 P01023	Alpha-2-macroglobulin		W B	W B			W B					W B	
NKVDLSFSPSQSLPAS	8 P01023	Alpha-2-macroglobulin						SB	SB					SB
NKVDLSFSPSQSLPA	6 P01023	Alpha-2-macroglobulin						SB	SB					SB
ANKVDLSFSPSQSLPA	5 P01023	Alpha-2-macroglobulin						SB	SB					SB
NKVDLSFSPSQSLP	5 P01023	Alpha-2-macroglobulin						SB						SB
KVYDYYETDEFALAEY	6 P01023	Alpha-2-macroglobulin						W B						W B
VDLSFSPSQSLPASH	4 P01023	Alpha-2-macroglobulin						SB	SB					SB
VDLSFSPSQSLPASHA	1 P01023	Alpha-2-macroglobulin												SB
FSSKFQVDNNRLL	6 P01023	Alpha-2-macroglobulin	SB							SB	SB			
AYIFIDEAHITQ	5 P01023	Alpha-2-macroglobulin	W B							W B				
SSKFQVDNNRLL	2 P01023	Alpha-2-macroglobulin	SB											
ARAYIFIDEAHITQ	2 P01023	Alpha-2-macroglobulin	W B											
SSKFQVDNNRLL	1 P01023	Alpha-2-macroglobulin	W B											
FSSKFQVDNNRLL	1 P01023	Alpha-2-macroglobulin	W B											
GTFFSSKFQVDNNRLL	1 P01023	Alpha-2-macroglobulin	W B											
SGTFSSKFQVDNNRLL	1 P01023	Alpha-2-macroglobulin	W B											
SATNIVKWITKQQAQGG	2 P01023	Alpha-2-macroglobulin		W B										
SATNIVKWITKQQAQG	3 P01023	Alpha-2-macroglobulin		SB										
DSLVFVQTDKSIYKPG	1 4 P01023	Alpha-2-macroglobulin			W B	W B	W B	W B						
EDSLVFVQTDKSIYKPG	1 7 P01023	Alpha-2-macroglobulin			W B	W B	W B	W B						W B
NEDSLVFVQTDKSIYKPG	1 3 P01023	Alpha-2-macroglobulin			W B	W B	W B							

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	PSM	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad													
					1	2	3	7	12	14	21	22						
EDSLVFVQTDKSIYKP	4 P01023	Alpha-2-macroglobulin		Péptid PSM	DR*03/01	DR*13/01	DR*13/05	DR*15/01	DR*04/04	DR*13/02	DR*07/01	DR*13/02	DR*03/01	DR*13/03	DR*01/02	DR*13/01	DR*13/02	DR*07/01
					W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
					B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
DSLVFVQTDKSIYKP	5 P01023	Alpha-2-macroglobulin			W	W				W								W
					B	B				B								B
NEDSLVFVQTDKSIYKP	1 P01023	Alpha-2-macroglobulin					W											
							B											
TQDTVVALHALSKYGAA	2 P01023	Alpha-2-macroglobulin					W											
							B											
SLVFVQTDKSIYKPG	1 P01023	Alpha-2-macroglobulin					W											
							B											
FYYLIMAKGGIVR	1 P01023	Alpha-2-macroglobulin					W											
							B											
GNRIAQWQSFQLEGG	4 P01023	Alpha-2-macroglobulin							SB								SB	SB
GNRIAQWQSFQLEGGL	4 P01023	Alpha-2-macroglobulin							SB								SB	SB
EDSLVFVQTDKSIYKP	4 P01023	Alpha-2-macroglobulin					W	W	W	W								
							B	B	B	B								
DSLVFVQTDKSIYKP	5 P01023	Alpha-2-macroglobulin					W	W			W							W
							B	B			B							B
DSLVFVQTDKSIYKPG	1 P01023	Alpha-2-macroglobulin					SB	SB	SB	SB	SB							
	4																	
EDSLVFVQTDKSIYKPG	1 P01023	Alpha-2-macroglobulin					SB	SB	SB	SB	SB							SB
	7																	
NEDSLVFVQTDKSIYKPG	1 P01023	Alpha-2-macroglobulin					SB	SB	SB									
	3																	
EDSLVFVQTDKSIYKP	4 P01023	Alpha-2-macroglobulin					SB	SB	SB	SB								
ELIPLVYIQDPKGN	2 P01023	Alpha-2-macroglobulin							SB									
LIPLVYIQDPKGN	3 P01023	Alpha-2-macroglobulin							SB									
EPEGLEKETTFNSLL	2 P01023	Alpha-2-macroglobulin							W									
									B									
SVYNLLPEKDLTGFPGPL	1 P01023	Alpha-2-macroglobulin							W									
									B									
DSLVFVQTDKSIYKPG	1 P01023	Alpha-2-macroglobulin					W	W	W	W								
	4						B	B	B	B								
EDSLVFVQTDKSIYKPG	1 P01023	Alpha-2-macroglobulin					W	W	W	W								W
	7						B	B	B	B								B
NEDSLVFVQTDKSIYKPG	1 P01023	Alpha-2-macroglobulin					W	W	W									
	3						B	B	B									
EDSLVFVQTDKSIYKP	4 P01023	Alpha-2-macroglobulin					W	W	W	W								
							B	B	B	B								
NKVDLSFSPSQSLPAS	8 P01023	Alpha-2-macroglobulin								SB	SB							SB
NKVDLSFSPSQSLPA	6 P01023	Alpha-2-macroglobulin								SB	SB							SB
ANKVDLSFSPSQSLPA	5 P01023	Alpha-2-macroglobulin								SB	SB							SB
NKVDLSFSPSQSLP	5 P01023	Alpha-2-macroglobulin								SB								SB
ISLSVSYTGSRASNM	2 P01023	Alpha-2-macroglobulin							W									
									B									
KVYDYYETDEFAIAEY	6 P01023	Alpha-2-macroglobulin							W									W
									B									B
VDLSFSPSQSLPASH	4 P01023	Alpha-2-macroglobulin							SB	SB								SB
LANKVDLSFSPSQSLPA	2 P01023	Alpha-2-macroglobulin							SB									
ANKVDLSFSPSQSLP	2 P01023	Alpha-2-macroglobulin							SB									

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad														
			PSM	MCF-7													
					1	2	3	7	12	14	21	22					
Pepid	PSM	DR*03:01	DR*13:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01	
LSFSPSQSLPASHA	2 P01023	Alpha-2-macroglobulin						SB									
ANKVDLSFSPSQSLPAS	2 P01023	Alpha-2-macroglobulin						SB	SB								
KVYDYETDEFAIAE	2 P01023	Alpha-2-macroglobulin						W									
KVDLSFSPSQSLPA	4 P01023	Alpha-2-macroglobulin						SB	SB								
IVKVYDYETDEFAIAE	2 P01023	Alpha-2-macroglobulin						W									
VKVYDYETDEFAIAE	1 P01023	Alpha-2-macroglobulin						W									
VKVYDYETDEFAIAEY	2 P01023	Alpha-2-macroglobulin						W									
IVKVYDYETDEFAIAEY	2 P01023	Alpha-2-macroglobulin						W									
KVDLSFSPSQSLP	1 P01023	Alpha-2-macroglobulin											SB				
KVDLSFSPSQSLPAS	3 P01023	Alpha-2-macroglobulin											SB	SB			
DSLVFVQTDKSIYKPG	1 4	Alpha-2-macroglobulin			W B	W B	W B	W B									
EDSLVFVQTDKSIYKPG	1 7	Alpha-2-macroglobulin			W B	W B	W B	W B								W B	
DSLVFVQTDKSIYKP	5 P01023	Alpha-2-macroglobulin			W B	W B		W B								W B	
NKVDLSFSPSQSLPAS	8 P01023	Alpha-2-macroglobulin						W B	W B							W B	
NKVDLSFSPSQSLPA	6 P01023	Alpha-2-macroglobulin						W B	W B							W B	
ANKVDLSFSPSQSLPA	5 P01023	Alpha-2-macroglobulin						W B	W B							W B	
VDLSFSPSQSLPASH	4 P01023	Alpha-2-macroglobulin						W B	W B							W B	
ANKVDLSFSPSQSLPAS	2 P01023	Alpha-2-macroglobulin						W B	W B								
KVDLSFSPSQSLPA	4 P01023	Alpha-2-macroglobulin						W B	W B								
KVDLSFSPSQSLPAS	3 P01023	Alpha-2-macroglobulin						W B	W B								
FSSKFQVDNRRLL	6 P01023	Alpha-2-macroglobulin						SB						SB	SB		
AYIFIDEAHITQ	5 P01023	Alpha-2-macroglobulin			W B							W B					
FSSKFQVDNRRLL	6 P01023	Alpha-2-macroglobulin						SB						SB	SB		
ASPAFLAVPEKEQAPH	2 P01023	Alpha-2-macroglobulin												SB			
EGTVVELTGRQSSE	1 P01023	Alpha-2-macroglobulin													SB		
EEGTVVELTGRQSSE	1 P01023	Alpha-2-macroglobulin													SB		
AGLGISSTASLRAFQPF	9 P01023;P20742	Alpha-2-macroglobulin; Pregnancy zone protein												SB	SB		SB
AGLGISSTASLRAFQP	1 P01023;P20742	Alpha-2-macroglobulin; Pregnancy zone protein															SB

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad												
			MCF-7												
				1	2	3	7	12	14	21	22				
Peptid PSM	PSM	DR*03:01	DR*13:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01
AGLGSSTASLRAFQPF	9 P01023;P20742	Alpha-2-macroglobulin; Pregnancy zone protein					W B	W B							W B
GLGISSTASLRAF	1 P01023;P20742	Alpha-2-macroglobulin; Pregnancy zone protein					W B								
LGISSTASLRAFQPF	1 P01023;P20742	Alpha-2-macroglobulin; Pregnancy zone protein					W B								
AGLGSSTASLRAFQPF	9 P01023;P20742	Alpha-2-macroglobulin; Pregnancy zone protein					SB	SB							SB
DAGLGSSTASLRAFQPF	2 P01023;P20742	Alpha-2-macroglobulin; Pregnancy zone protein						W B							
EDAGLGSSTASLRAFQPF	1 P01023;P20742	Alpha-2-macroglobulin; Pregnancy zone protein						W B							
AGLGSSTASLRA	1 P01023;P20742	Alpha-2-macroglobulin; Pregnancy zone protein						W B							
VMQDFFIDRLPY	7 P01024	Complement C3	W B							W B	W B				W B
QDFFIDRLPY	5 P01024	Complement C3	W B												W B
SPMYSITPNILR	5 P01024	Complement C3						SB	SB	SB					SB
SPMYSITPNILRLE	4 P01024	Complement C3							SB	SB					SB
SPMYSITPNILRLESE	4 P01024	Complement C3							SB						SB
SPMYSITPNILRLES	3 P01024	Complement C3							SB						SB
SPMYSITPNILRL	1 P01024	Complement C3													SB
QDFFIDRLPY	5 P01024	Complement C3	SB												SB
VMQDFFIDRLPY	7 P01024	Complement C3	SB							SB	SB				SB
QDFFIDRLPY	5 P01024	Complement C3	SB							SB	SB				
DAPDHQELNLDVSLQLPS	3 P01024	Complement C3	W B												
TVMQDFFIDRLPY	1 P01024	Complement C3	SB												
VMQDFFIDRLPY	2 P01024	Complement C3	SB							SB	SB				SB
VMQDFFIDRLPY	3 P01024	Complement C3	SB												
MQDFFIDRLPY	1 P01024	Complement C3	SB												
DFFIDRLPY	1 P01024	Complement C3	W B												
ITTDFFPSFRLVAYYT	1 P01024	Complement C3								SB					

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad											
			PSM	MCF-7										
				1	2	3	7	12	14	21	22			
SNLDEDIAEENIVSRSE	1 P01024	Complement C3				SB								
TAFVIFGIQDGEQR	2 P01024	Complement C3				SB								
SNLDEDIAEENIVSRSEFP E	2 P01024	Complement C3				SB								
ESETRILLQGTPVAQMTE	2 P01024	Complement C3				SB								
ETRILLQGTPVAQMT	2 P01024	Complement C3				SB								
DEDIAEENIVSR	3 P01024	Complement C3				SB	SB							
LDEDIAEENIVSR	2 P01024	Complement C3				SB	SB							
SETRILLQGTPVAQMT	2 P01024	Complement C3				SB								
SETRILLQGTPVAQMT	2 P01024	Complement C3				SB								
DEDIAEENIVSRSE	2 P01024	Complement C3				SB	SB							
ETRILLQGTPVAQM	3 P01024	Complement C3				SB								
SNLDEDIAEENIVSR	2 P01024	Complement C3				SB								
ESETRILLQGTPVAQMT	2 P01024	Complement C3				SB								
AFVIFGIQDGEQR	4 P01024	Complement C3				SB								
SETRILLQGTPVAQM	2 P01024	Complement C3				SB								
LDEDIAEENIVSRSE	3 P01024	Complement C3				SB	SB							
LPVGRITVMVNIENPEGIPV	4 P01024	Complement C3				SB								
SETRILLQGTPVAQMTE	2 P01024	Complement C3				SB								
NLDEDIAEENIVSRSE	2 P01024	Complement C3				SB	SB							
LDEDIAEENIVSRSEFP E	2 P01024	Complement C3				SB								
LDEDIAEENIVSR	2 P01024	Complement C3				SB	SB							
ETRILLQGTPVAQ	2 P01024	Complement C3				SB								
VPYVIVPLKTGLQEVE	9 P01024	Complement C3				SB								
LPVGRITVMVNIENPEGIPV K	1 P01024	Complement C3				SB								
VPYVIVPLKTGLQE	1 P01024 3	Complement C3				SB								
NLDEDIAEENIVSR	1 P01024	Complement C3				SB	SB							
ITPNILRLESEETM	1 P01024	Complement C3						W B						
ETRILLQGTPVAQMT	2 P01024	Complement C3				SB								
VPYVIVPLKTGLQEVEV	2 P01024	Complement C3				SB								
VPYVIVPLKTGLQ	2 P01024	Complement C3						W B						
DEDIAEENIVSRSEFP E	2 P01024	Complement C3				SB								

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	PSM	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad												
					Péptid PSM	1	2	3	7	12	14	21	22				
LPVGRITVMVNIENPEGIPV	3 P01024	Complement C3			DR*0301			SB									
EDIAEENIVSRS	1 P01024	Complement C3			DR*1301			SB									
SETRILLQGTPVAQ	2 P01024	Complement C3			DR*1305			SB									
EDIAEENIVSRSEFPE	2 P01024	Complement C3			DR*1501			SB									
RTVMVNIENPEGIPV	3 P01024	Complement C3			DR*0404			SB									
ETRILLQGTPVAQM	2 P01024	Complement C3			DR*0701			SB									
NLDEDIAEENIVSRSEFPE	1 P01024	Complement C3			DR*1302			SB									
RTVMVNIENPEGIPV	5 P01024	Complement C3			DR*1302			SB									
FVIFGIQDGEQR	2 P01024	Complement C3			DR*0301			W B									
QNMIGMTPTVIAVH	2 P01024	Complement C3			DR*1303			W B									
ESETRILLQGTPVAQMT	2 P01024	Complement C3			DR*0102			SB									
EDIAEENIVSRSE	1 P01024	Complement C3			DR*1301			SB SB									
LPVGRITVMVNIENPEGIPV KQ	1 P01024	Complement C3			DR*1501			W B									
ITPNILRLESEETM	1 P01024	Complement C3			DR*0404			W B									
DEDIAEENIVSR	3 P01024	Complement C3			DR*0701			W B B									
LDEDIAEENIVSR	2 P01024	Complement C3			DR*1302			W B B									
DEDIAEENIVSRSE	2 P01024	Complement C3			DR*1303			W B B									
SPMYSITPNILR	2 P01024	Complement C3			DR*0102			W B B	W B B	W B B							W B
LDEDIAEENIVSRSE	3 P01024	Complement C3			DR*0301			W B B	W B B	W B B							
NLDEDIAEENIVSRSE	2 P01024	Complement C3			DR*1301			W B B	W B B	W B B							
LDEDIAEENIVSRS	2 P01024	Complement C3			DR*1501			W B B	W B B	W B B							
SPMYSITPNILR	5 P01024	Complement C3			DR*0404			W B B	W B B	W B B							W B
NLDEDIAEENIVSR	1 P01024	Complement C3			DR*0701			W B B	W B B	W B B							
EDIAEENIVSRSE	1 P01024	Complement C3			DR*1302			W B B	W B B	W B B							
SPMYSITPNILR	5 P01024	Complement C3			DR*1302			SB SB SB	SB SB SB	SB SB SB							SB
SPMYSITPNILRLE	4 P01024	Complement C3			DR*1302			SB SB	SB SB	SB SB							SB
SPMYSITPNILRLESE	4 P01024	Complement C3			DR*1302			SB	SB	SB							SB
SPMYSITPNILRLES	3 P01024	Complement C3			DR*1302			SB	SB	SB							SB
SPMYSITPNILRLESEET	2 P01024	Complement C3			DR*1302			W B	W B	W B							
LPYSVVRNEQVE	1 P01024	Complement C3			DR*1302			W B	W B	W B							
SPMYSITPNILR	5 P01024	Complement C3			DR*1302			W B B	W B B	W B B							W B

Secuencia	Identificador	Descripción	PSM	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad																	
				MCF-7																	
				1	2	3	7	12	14	21	22										
SPMYSIITPNILRLLE	4 P01024	Complement C3		DR*03:01	DR*13:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01	W B	W B	W B
VMQDFFDLRLPYS	7 P01024	Complement C3		SB								SB	SB							SB	
QDFFDLRLPYS	5 P01024	Complement C3		SB								SB	SB								
VMQDFFDLRLPYS	7 P01024	Complement C3		W B								W B	W B							W B	
QDFFDLRLPYS	5 P01024	Complement C3		W B								W B	W B								
LPSFEVIVEPTEKF	2 P01024	Complement C3													W B						
LPSFEVIVEPTEK	2 P01024	Complement C3													W B						
EYVLPSEVIVEPTEK	1 P01024	Complement C3													W B						
YVLPSEVIVEPTEK	1 P01024	Complement C3													W B						
DKPVYTPDQSVKV	1 P01031	Complement C5		W B																	
DGHVILQLNSIPSSDF	2 P01031	Complement C5						SB													
DAADIRFVYTPAMES	2 P01033	Metalloproteinase inhibitor 1						SB	SB												
DAADIRFVYTPAMES	2 P01033	Metalloproteinase inhibitor 1						W B	W B												
LRNVVALDTEVASN	1 P01130	Low-density lipoprotein receptor						SB													
NSNQIKILGNQGSFL	7 P01730	T-cell surface glycoprotein CD4						SB													
SNQIKILGNQGSF	2 P01730	T-cell surface glycoprotein CD4						SB													
NSNQIKILGNQGSF	4 P01730	T-cell surface glycoprotein CD4						SB													
NSNQIKILGNQGSFLT	2 P01730	T-cell surface glycoprotein CD4						SB	SB												
SNQIKILGNQGSFL	3 P01730	T-cell surface glycoprotein CD4						SB													
SNQIKILGNQGS	2 P01730	T-cell surface glycoprotein CD4						SB													
NQIKILGNQGSFL	1 P01730	T-cell surface glycoprotein CD4						SB													
NSNQIKILGNQGSFLT	2 P01730	T-cell surface glycoprotein CD4						W B	W B												
VAVIWDGSKNYADSV	2 P01772	Immunoglobulin heavy variable 3-33		SB																	
VAVIWDGSKNYADS	1 P01772	Immunoglobulin heavy variable 3-33		SB	SB																
VAVIWDGSKNYADS	1 P01772	Immunoglobulin heavy variable 3-33		W B	W B																
VANIKQDGSEKYYVDS	1 P01780	Immunoglobulin heavy variable 3-7		SB																	
DSKDSTYSLSSTLTL	1 P01834	Immunoglobulin kappa constant								W B											
DSTYSLSSTL.TLSK	2 P01834	Immunoglobulin kappa constant									SB										
DSTYSLSSTL.TLSKA	1 P01834	Immunoglobulin kappa constant									SB										
GGKYAATSQVLLPS	1 P01871	Immunoglobulin heavy constant mu									SB										

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad													
			MCF-7													
				1	2	3	7	12	14	21	22					
Peptid PSM			DR*03:01	DR*13:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01
ISVGYVDDTQFVRFDS	2 P01889	HLA class I histocompatibility antigen, B-7 alpha chain									SB					
DTQFVRFDSDAASQR	1 P01891	HLA class I histocompatibility antigen, A-68 alpha chain								SB	SB					
DTQFVRFDSDAASQR	1 P01891	HLA class I histocompatibility antigen, A-68 alpha chain								SB	SB					
IAVGYVDDTQFVRFDS	2 P01891	HLA class I histocompatibility antigen, A-68 alpha chain										SB				
DGKDYALALNEDLRSWTA	1 P01891;P01889	HLA class I histocompatibility antigen alpha chain (several)							W B							
VPPEVTVLTNSPVELREPN	1 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain							W B	W B	W B					W B
VPPEVTVLTNSPVELR	3 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain							W B	W B						W B
ALANIAVDKANLEIMT	3 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	SB								SB	SB				
LANIAVDKANLEIM	2 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	SB								SB	SB				
ALANIAVDKANLEIM	2 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	SB								SB	SB				
ANIAVDKANLEIMT	2 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	SB								SB	SB				
VPPEVTVLTNSPVELREPN	1 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain							W B	W B	W B					W B
AQGALANIAVDKANLEI	6 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain								SB	SB	SB				
QGALANIAVDKANLE	3 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain									SB					
QGALANIAVDKANLEI	2 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain									SB	SB				

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad													
			PSM	MCF-7												
				1	2	3	7	12	14	21	22					
Peptid	PSM	DR*03:01	DR*13:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01
AQGALANIAVDKAN	1 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain					SB									
AQGALANIAVDKANLE	6 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain					SB									
VPPEVTVLITNSPVELR	3 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain					SB SB									SB
ALANIAVDKANLEIM	2 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	W B				W B	W B								
VPPEVTVLITNSPVELREPN	1 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain					W B	W B	W B							W B
AQGALANIAVDKANLEI	6 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain					W B	W B	W B							
QGALANIAVDKANLEI	2 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain					W B	W B								
VPPEVTVLITNSPVELR	3 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain					W B	W B								W B
ALANIAVDKANLEIM	2 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	W B				W B	W B								
VPPEVTVLITNSPVELREPN	1 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain					W B	W B	W B							W B
AQGALANIAVDKANLEI	6 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain					W B	W B	W B							
ALANIAVDKANLEIMT	3 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	SB							SB SB						
LANIAVDKANLEIM	2 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	SB							SB SB						
GALANIAVDKANLEIMT	2 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain								SB SB						
AQGALANIAVDKANLEIM T	2 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain								SB SB						

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad															
			MCF-7															
				1	2	3	7	12	14	21	22							
	PSM		Péptid PSM	DR*03:01	DR*13:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01
GALANIAVDKANLEIMT	1 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain										SB	SB					
LANIAVDKANLEIMT	1 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain										SB	SB					
LANIAVDKANLEIMT	2 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain										SB	SB					
ANIAVDKANLEIM	1 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain										SB	SB					
ANIAVDKANLEIMT	2 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain		SB								SB	SB					
GALANIAVDKANLEIM	1 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain										SB	SB					
ALANIAVDKANLEIMT	3 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain		SB								SB	SB					
LANIAVDKANLEIM	2 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain		SB								SB	SB					
GALANIAVDKANLEIMT	2 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain										SB	SB					
AQGALANIAVDKANLEIMT	2 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain										SB	SB					
GALANIAVDKANLEIMT	1 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain										SB	SB					
LANIAVDKANLEIMT	1 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain										SB	SB					
LANIAVDKANLEIMT	2 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain										SB	SB					
ANIAVDKANLEIM	1 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain										SB	SB					
ANIAVDKANLEIMT	2 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain		SB								SB	SB					

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad											
			PSM	MCF-7										
					1	2	3	7	12	14	21	22		
Peptid PSM	DR*03:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01
GALANIAVDKANLEIM	1 P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain											SB SB	
EVPEVTVFSKSPVTLGQPN	2 P01909	HLA class II histocompatibility antigen, DQ alpha 1 chain												W B
TNEVPEVTVFSKSPVT	1 P01909	HLA class II histocompatibility antigen, DQ alpha 1 chain												SB
EDIVADHVASYGVN	5 P01909	HLA class II histocompatibility antigen, DQ alpha 1 chain	SB SB		SB SB			SB SB						
EDIVADHVASYGVNL	2 P01909	HLA class II histocompatibility antigen, DQ alpha 1 chain	SB SB											
EDIVADHVASYG	1 P01909	HLA class II histocompatibility antigen, DQ alpha 1 chain	SB											
EDIVADHVASYGVN	5 P01909	HLA class II histocompatibility antigen, DQ alpha 1 chain	W B W B		W B W B			W B W B						
EDIVADHVASYGVNL	2 P01909	HLA class II histocompatibility antigen, DQ alpha 1 chain	W B W B											
EDIVADHVASYGVN	5 P01909	HLA class II histocompatibility antigen, DQ alpha 1 chain	W B W B		W B W B			W B W B						
EDIVADHVASYGVN	5 P01909	HLA class II histocompatibility antigen, DQ alpha 1 chain	SB SB		SB SB			SB SB						
EDIVADHVASYGVN	5 P01909	HLA class II histocompatibility antigen, DQ alpha 1 chain	SB SB		SB SB			SB SB						
EDIVADHVASYGVN	5 P01909	HLA class II histocompatibility antigen, DQ alpha 1 chain	W B W B		W B W B			W B W B						
AATVGS LAGQPLQERAQ	1 P02649	Apolipoprotein E												SB
AATVGS LAGQPLQER	1 P02649	Apolipoprotein E												SB
TGIFTDQVLSVLKG	3 P02655	Apolipoprotein C-II	W B					W B						
STYTGIFTDQVLSVLKG	2 P02655	Apolipoprotein C-II	W B											
TGIFTDQVLSVLKG	3 P02655	Apolipoprotein C-II	W B					W B						
YTGIFTDQVLSVLKG	2 P02655	Apolipoprotein C-II											SB	
MPSPTFLTQVKESLSS	1 P02655	Apolipoprotein C-II											W B	

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad																
			MCF-7																
				1	2	3	7	12	14	21	22								
PSM			Péptid PSM	DR*03:01	DR*13:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01	
FDHVITNMNNNYEPR	2 P02746	Complement C1q subcomponent subunit B							SB	SB									
FDHVITNMNNNYE	1 P02746	Complement C1q subcomponent subunit B							W	W	B	B							
FDHVITNMNNNYEP	1 P02746	Complement C1q subcomponent subunit B							SB	SB									
FDHVITNMNNNYEP	1 P02746	Complement C1q subcomponent subunit B							SB	SB									
DHVITNMNNNYEP	2 P02746	Complement C1q subcomponent subunit B							SB	SB									
FDHVITNMNNNYEPR	2 P02746	Complement C1q subcomponent subunit B							SB	SB									
FDHVITNMNNNYE	1 P02746	Complement C1q subcomponent subunit B							W	W	B	B							
FDHVITNMNNNYEP	1 P02746	Complement C1q subcomponent subunit B							SB	SB									
FDHVITNMNNNYEP	1 P02746	Complement C1q subcomponent subunit B							SB	SB									
DHVITNMNNNYEP	2 P02746	Complement C1q subcomponent subunit B							SB	SB									
AYNTFQVITGGMVLK	1 P02746	Complement C1q subcomponent subunit B											SB						
AGILENGAVRYTTF	4 P02749	Beta-2-glycoprotein 1							SB	SB									SB
AGILENGAVRYTTF	4 P02749	Beta-2-glycoprotein 1							SB	SB									SB
AGILENGAVRYTT	2 P02749	Beta-2-glycoprotein 1							SB										
AGILENGAVRYTTF	4 P02749	Beta-2-glycoprotein 1							SB	SB									SB
AGILENGAVRYTTFE	2 P02749	Beta-2-glycoprotein 1									W	B							
GPMKEINLAPDSSVVV	2 P02751	Fibronectin							SB										
GPMKEINLAPDSSVV	2 P02751	Fibronectin							SB										
IPAPTDLKFTQVTPISLSAQ	2 P02751	Fibronectin									SB								
APSNLRFIATTPNSL	2 P02751	Fibronectin									SB								
APITGYRIVYSPSVEGS	2 P02751	Fibronectin									SB	SB							
APITGYRIVYSPSVE	2 P02751	Fibronectin									SB								
APSNLRFIATTPNSLL	1 P02751	Fibronectin									SB								
APITGYRIVYSPSVEG	2 P02751	Fibronectin									SB	SB							
APITGYRIVYSPSV	1 P02751	Fibronectin									SB								
APITGYRIVYSPSVEGS	2 P02751	Fibronectin									W	W	B	B					
APITGYRIVYSPSVEG	2 P02751	Fibronectin									W	W	B	B					

Secuencia	Identificador	Descripción	PSM	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad										
				MCF-7										
				1	2	3	7	12	14	21	22			
AAVYQPQHPQPPPY	1 P02751	Fibronectin								W B				
LNQIDEVKVWPQPS	2 P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein				W B								
YTIAALLSPYSYSTTAVVTN PKE	7 P02766	Transthyretin							SB				SB	
LLSPYSYSTTAVVTNPK	6 P02766	Transthyretin							SB				SB	
SPYSYSTTAVVTNPK	5 P02766	Transthyretin							SB				SB	
IAALLSPYSYSTTAVVTNPK E	6 P02766	Transthyretin							SB				SB	
ALLSPYSYSTTAVVTNPK	3 P02766	Transthyretin							SB				SB	
LSPYSYSTTAVVTNPK	6 P02766	Transthyretin							SB				SB	
TIAALLSPYSYSTTAVVTNP KE	4 P02766	Transthyretin							SB				SB	
SPYSYSTTAVVTNPK	5 P02766	Transthyretin							SB				SB	
YTIAALLSPYSYSTTAVVTN PKE	7 P02766	Transthyretin							SB				SB	
LLSPYSYSTTAVVTNPK	6 P02766	Transthyretin							SB				SB	
SPYSYSTTAVVTNPK	5 P02766	Transthyretin							SB				SB	
IAALLSPYSYSTTAVVTNPK E	6 P02766	Transthyretin							SB				SB	
LLSPYSYSTTAVVTNPK	2 P02766	Transthyretin							SB					
ALLSPYSYSTTAVVTNPK	3 P02766	Transthyretin							SB				SB	
ALLSPYSYSTTAVVTNPK	2 P02766	Transthyretin							SB					
LSPYSYSTTAVVTNPK	6 P02766	Transthyretin							SB				SB	
TIAALLSPYSYSTTAVVTNP KE	4 P02766	Transthyretin							SB				SB	
AALLSPYSYSTTAVVTNPK	2 P02766	Transthyretin							SB					
SPYSYSTTAVVTNPK	5 P02766	Transthyretin							SB				SB	
TIAALLSPYSYSTTAVVTNP K	1 P02766	Transthyretin							SB					
LSPYSYSTTAVVTNPK	1 P02766	Transthyretin							SB					
YTIAALLSPYSYSTTAVVTN PK	1 P02766	Transthyretin							SB					
DSAQNSVIIVDKNGRLV	4 P02786	Transferrin receptor protein 1		5	7	SB	SB			SB	SB		SB	SB
ENPGGYVAYSKAATVTG	2 P02786	Transferrin receptor protein 1		5	7				W B	W B			W B	W B
DSAQNSVIIVDKNGRL	5 P02786	Transferrin receptor protein 1		5	7	SB	SB		SB	SB			SB	SB
NSVIIVDKNGRLV	2 P02786	Transferrin receptor protein 1		5	7	SB	SB						SB	SB
DSAQNSVIIVDKNGRLV	4 P02786	Transferrin receptor protein 1		5	7	SB	SB			SB	SB		SB	SB
ENPGGYVAYSKAATVTG	2 P02786	Transferrin receptor protein 1		5	7				SB	SB			SB	SB
DSAQNSVIIVDKNGRL	5 P02786	Transferrin receptor protein 1		5	7	W B	W B		W B	W B			W B	W B

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad															
				1		2		3		7		12		14		21		22	
				Péptid	PSM	Péptid	PSM	Péptid	PSM	Péptid	PSM	Péptid	PSM	Péptid	PSM	Péptid	PSM	Péptid	PSM
NSVIIVDKNGRLV	2 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7 SB SB	DR*03/01	DR*13/01	DR*15/01	DR*04/04	DR*13/02	DR*07/01	DR*13/02	DR*03/01	DR*13/03	DR*01/02	DR*13/02	DR*13/01	DR*13/02	DR*07/01		
DSAQNSVIIVDKNGRLV	4 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7 SB SB							SB SB					SB SB				
DSAQNSVIIVDKNGRL	5 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7 SB SB					SB		SB					SB SB				
DSAQNSVIIVDKNGRLVYL	2 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7 SB SB																
AQNSVIIVDKNGRLV	2 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7 SB SB																
NSVIIVDKNGRL	1 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7 SB SB																
NSVIIVDKNGRLV	2 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7 SB SB												SB SB				
DSAQNSVIIVDKNGRLV	4 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7 SB SB								SB SB				SB SB				
DSAQNSVIIVDKNGRL	5 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7 SB SB					SB		SB					SB SB				
DSAQNSVIIVDKNGRLVYL	2 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7 SB SB																
AQNSVIIVDKNGRLV	2 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7 SB SB																
NSVIIVDKNGRL	1 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7 SB SB																
NSVIIVDKNGRLV	2 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7 SB SB												SB SB				
NGRLVYLVENPGGYV	6 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7					SB											
NGRLVYLVENPGGYVA	2 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7					SB SB											
GRLVYLVENPGGYV	5 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7					SB											
GRLVYLVENPGGY	2 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7					SB											
AEKVANAESLNAIG	2 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7					SB											
DSAQNSVIIVDKNGRL	5 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7 W B W B					W B		W B					W B	W B			
NGRLVYLVENPGGYVA	2 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7					W B	W B										
NPGGYVAYSKAATVTG	6 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7					SB SB SB					SB SB						
NPGGYVAYSKAATVTG	6 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7					SB SB SB					SB SB						
PGGYVAYSKAATVTG	2 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7					SB SB											
ENPGGYVAYSKAATVTG	2 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7					SB SB							SB SB				
NPGGYVAYSKAATVTGK	2 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7					SB SB											
NPGGYVAYSKAATVTG	6 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7					SB SB SB					SB SB						
PGGYVAYSKAATVTG	2 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7					SB SB											
ENPGGYVAYSKAATVTG	2 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7					SB SB							SB SB				
NPGGYVAYSKAATVTGK	2 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7					SB SB											
GRLVYLVENPGGYVA	1 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7					W B											
DSAQNSVIIVDKNGRLV	4 P02786	Transferrin receptor protein 1	5 7 SB SB								SB SB				SB SB				

Secuencia	Identificador	Descripción	PSM	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad															
					1		2		3		7		12		14		21		22	
					Peptid PSM	DR*E3:01	DR*E3:01	DR*E3:05	DR*E5:01	DR*04:04	DR*E3:02	DR*07:01	DR*E3:01	DR*E3:03	DR*01:02	DR*E3:02	DR*E3:01	DR*E3:02	DR*E3:01	DR*E3:02
DSAQNSVIIVDKNGRL	5 P02786	Transferrin receptor protein 1	5	7	SB	SB			SB		SB				SB	SB				
DSAQNSVIIVDKNGRLV	4 P02786	Transferrin receptor protein 1	5	7	W	W					W	W			W	W				
NPGGYVAYSKAATVTG	6 P02786	Transferrin receptor protein 1	5	7					W	W	W			W	W					
NPGGYVAYSKAATVTG	6 P02786	Transferrin receptor protein 1	5	7					SB	SB	SB			SB	SB					
DPQTFYYAVAVVKKDSG	1 P02787	Serotransferrin					W	W												
EDPQTFYYAVAVVKKDSG	2 P02787	Serotransferrin					W	W												
EDPQTFYYAVAVVK	2 P02787	Serotransferrin					W	B												
DPQTFYYAVAVVKKDSG	1 P02787	Serotransferrin					W	W												
EDPQTFYYAVAVVKKDSG	2 P02787	Serotransferrin					W	W												
DPQTFYYAVAVVK	1 P02787	Serotransferrin					W	B												
IAKIMNGEADAMSLDG	2 P02787	Serotransferrin												W	B					
IAKIMNGEADAMSLDG	1 P02787	Serotransferrin												W	B					
AKIMNGEADAMSLDG	2 P02787	Serotransferrin												W	B					
TQVYVFLTKGGYTL	3 P02790	Hemopexin												W	B					
TQVYVFLTKGGYTLVSG	2 P02790	Hemopexin												W	B					
GTQVYVFLTKGGYTL	4 P02790	Hemopexin												W	W					
TQVYVFLTKGGYTLVS	2 P02790	Hemopexin												W	B					
GTQVYVFLTKGGYTLVSG	2 P02790	Hemopexin												W	B					
TQVYVFLTKGGYT	2 P02790	Hemopexin												SB	SB					
GTQVYVFLTKGGYT	2 P02790	Hemopexin												SB	SB					
GTQVYVFLTKGGYTL	4 P02790	Hemopexin												W	W					
TQVYVFLTKGGYT	2 P02790	Hemopexin												W	W					
GTQVYVFLTKGGYT	2 P02790	Hemopexin												W	W					
TPHGILDSVDAAFI	1 P02790	Hemopexin													W	B				
TPHGILDSVDAAF	2 P02790	Hemopexin													W	B				
SPGGTPTAIKVLNSVESGFS	1 P03952	Plasma kallikrein													SB					
IEGNLIFDPNNYLPKE	7 P04114	Apolipoprotein B-100												W	W					
VSVEFVTNMGIIIPDEA	2 P04114	Apolipoprotein B-100														W				
IEGNLIFDPNNYLPKE	7 P04114	Apolipoprotein B-100												SB	SB					
IVAHLLSSSSVIDAL	1 P04114	Apolipoprotein B-100																		
IEGNLIFDPNNYLPK	2 P04114	Apolipoprotein B-100												SB	SB					

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad									
				1	2	3	7	12	14	21	22		
	PSM		Péptid PSM										
KIEGNLIFDPNNYL	2 P04114	Apolipoprotein B-100	W B										
IERYEVDQIQVL	1 P04114	Apolipoprotein B-100	W B										
INNQLTLDSNTKY	1 P04114	Apolipoprotein B-100	SB										
ASYKADTVAKVQGV	1 P04114	Apolipoprotein B-100	W B										
SASYKADTVAKVQG	1 P04114	Apolipoprotein B-100	W B										
IEGNLIFDPNNYLPK	2 P04114	Apolipoprotein B-100	W B	W B				W B	W B				
TPEFTILNTFHIPS	2 P04114	Apolipoprotein B-100			W B	W B							
SNGVIVKINNQLTLD	3 P04114	Apolipoprotein B-100			SB	SB	SB						
TPEFTILNTFHIPS	2 P04114	Apolipoprotein B-100			SB	SB							
SNGVIVKINNQLTLD	3 P04114	Apolipoprotein B-100			SB	SB	SB						
AQPFEITASTNNEGNLK	2 P04114	Apolipoprotein B-100					SB						
TPDFIVPLTDLRIPS	1 P04114 2	Apolipoprotein B-100					SB	SB					
TPDFIVPLTDLRIPSVQ	1 P04114	Apolipoprotein B-100					SB						
TPDFIVPLTDLRIPSV	1 P04114	Apolipoprotein B-100					SB	SB					
IEGNLIFDPNNYLPKE	7 P04114	Apolipoprotein B-100				W B	W B	W B	W B	W B	W B	W B	W B
QPFEITASTNNEGNLK	2 P04114	Apolipoprotein B-100					SB	SB					
GVIVKINNQLTLD	2 P04114	Apolipoprotein B-100					SB	SB					
ETIQKLSNVLQQ	1 P04114	Apolipoprotein B-100					SB						
TPDFIVPLTDLRIP	2 P04114	Apolipoprotein B-100					SB	SB					
SNGVIVKINNQLTLD	3 P04114	Apolipoprotein B-100					SB	SB	SB				
TPDFIVPLTDLRIPS	1 P04114 2	Apolipoprotein B-100					W B	W B					
TPDFIVPLTDLRIPSV	1 P04114	Apolipoprotein B-100					W B	W B					
IEGNLIFDPNNYLPKE	7 P04114	Apolipoprotein B-100					SB	SB	SB	SB	SB	SB	SB
QPFEITASTNNEGNLK	2 P04114	Apolipoprotein B-100					W B	W B					
GVIVKINNQLTLD	2 P04114	Apolipoprotein B-100					SB	SB					
TPDFIVPLTDLRIP	2 P04114	Apolipoprotein B-100					W B	W B					
NPNGYSFSIPVKVLAD	1 P04114	Apolipoprotein B-100							SB	SB			
DIVAHLLSSSSVIDAL	2 P04114	Apolipoprotein B-100							W B				
NPNGYSFSIPVKVLA	1 P04114	Apolipoprotein B-100							SB	SB			
NPNGYSFSIPVKVLAD	1 P04114	Apolipoprotein B-100							W B	W B			
NPNGYSFSIPVKVLA	1 P04114	Apolipoprotein B-100							W B	W B			

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad											
			PSM	MCF-7										
				1	2	3	7	12	14	21	22			
Peptid PSM	DR*03:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01
IEGNLIFDPNNYLPK	2 P04114	Apolipoprotein B-100	SB	SB				SB	SB					
IEGNLIFDPNNYLPKE	7 P04114	Apolipoprotein B-100			SB	SB		SB	SB	SB	SB	SB	SB	SB
IEGNLIFDPNNYLPK	2 P04114	Apolipoprotein B-100	W	W				W	W					
IEGNLIFDPNNYLPKE	7 P04114	Apolipoprotein B-100	B	B				B	B	W	W	W	W	W
DFSAEYEDGKYEG	1 P04114	Apolipoprotein B-100								W				
NNAEWVYQGAIRQIDD	1 P04114	Apolipoprotein B-100								B				
IEGNLIFDPNNYLPKE	7 P04114	Apolipoprotein B-100			W	W		W	W	W	W	W	W	W
LEVANMQAELVAKPS	1 P04114	Apolipoprotein B-100			B	B		B	B	B	B	B	B	B
IEGNLIFDPNNYLPKE	7 P04114	Apolipoprotein B-100								SB				
TTAYFLYQQGRLDK	6 P04233	HLA class II histocompatibility antigen gamma chain												W
AENGLVINGNPITIFQ	6 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	88										SB
NGKLVINGNPITIFQ	5 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	88										SB
GKVDIVAINDPFIDL	8 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	88			SB	SB						
SGKVDIVAINDPFIDL	5 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	88			SB	SB						
KVDIVAINDPFID	4 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	88			SB	SB						
GKVDIVAINDPFID	4 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	88			SB	SB						
SGKVDIVAINDPFIDLN	2 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	88			SB	SB						
SGKVDIVAINDPFID	2 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	88			SB	SB						
KVDIVAINDPFIDL	2 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	88			SB	SB						
FNSGKVDIVAINDPFIDL	2 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	88			W	B						
ALQNIIPASTGAAKAVG	2 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	88			SB							
NSGKVDIVAINDPFIDL	2 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	88			W	B						
GKVDIVAINDPFI	1 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	88			W	B						
RVHSAPSADAPM	1 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	88			SB							
LQNIIPASTGAAKAVG	1 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	88			SB							

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	MCF-7	Muestra (DC19)-, alelo y predicción de afinidad													
				PSM													
				1	2	3	7	12	14	21	22						
LQNIIPASTGAAKA	1 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*03301			SB										
LQNIIPASTGAAK	1 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*13301			SB										
NIIPASTGAAKA	1 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*13305			W										
GKVDIVAINDPFIDL	8 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*04004			W	W									
SGKVDIVAINDPFIDL	5 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*04004			W	W									
KVDIVAINDPFID	4 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*04004			W	W									
GKVDIVAINDPFID	4 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*04004			W	W									
SGKVDIVAINDPFIDLN	2 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*04004			W	W									
SGKVDIVAINDPFID	2 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*04004			W	W									
KVDIVAINDPFIDL	2 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*04004			W	W									
ISWYDNEFGYSNRVVDL	2 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*07501									SB				
YDNEFGYSNRVVDL	2 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*07501									SB				
WYDNEFGYSNRVVDLMA	2 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*07501									SB				
WYDNEFGYSNRVVD	2 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*07501									SB				
YDNEFGYSNRVVDLMA	2 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*07501									SB				
DNEFGYSNRVVDL	2 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*07501									SB				
SWYDNEFGYSNRVVDL	2 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*07501									SB				
WYDNEFGYSNRVVDL	2 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*07501									SB				
NEFGYSNRVVDLMA	1 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*07501									SB				
WYDNEFGYSNRVVDLM	2 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*07501									SB				
YDNEFGYSNRVVDLM	2 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*07501									SB				
DNEFGYSNRVVDLMA	1 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*07501									SB				
YDNEFGYSNRVVDLM	1 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*07501									SB				
ISWYDNEFGYSNRVVD	2 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*07501									W				
													B				

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	PSM	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad										
				MCF-7										
					1	2	3	7	12	14	21	22		
YDNEFGYSNRVVD	1 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*03:01								SB		
SWYDNEFGYSNRVVDLMA	1 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*13:05								SB		
YDNEFGYSNRVVDLMA	1 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*15:01								SB		
WYDNEFGYSNRVVDLM	1 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*04:04								SB		
DNEFGYSNRVVD	2 P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 88 0	DR*13:02								SB		
FAEDVGSNKGAIIG	1 P05067	Amyloid-beta precursor protein	2 4	DR*03:01										W B
KTTVELLPVNGEF	2 P05067	Amyloid-beta precursor protein	2 4	DR*13:05			W B							
DVDGLDPSFTPATGTPVVG GL	3 P05089	Arginase-1		DR*15:01				SB						
LNQELRADGTVNQIEG	2 P05090	Apolipoprotein D	1 1	DR*07:01			SB SB							
NQELRADGTVNQIEG	2 P05090	Apolipoprotein D	1 1	DR*13:02			SB SB							
LNQELRADGTVNQIEG	2 P05090	Apolipoprotein D	1 1	DR*03:01			W B B	W B B						
NQELRADGTVNQIEG	2 P05090	Apolipoprotein D	1 1	DR*13:02			W B B	W B B						
LLVFATDDGFHFA	1 P05107	Integrin beta-2		DR*03:01	W B					W B				
LLVFATDDGFHFAG	6 P05107	Integrin beta-2		DR*13:05	W B					W B				
LLVFATDDGFHFAGDG	4 P05107	Integrin beta-2		DR*15:01	W B					W B				
LVFATDDGFHFAGDG	1 P05107	Integrin beta-2		DR*04:04	W B					W B				
AENNIQPIFAVTSR	2 P05107	Integrin beta-2		DR*07:01			W B							
LLVFATDDGFHFA	1 P05107	Integrin beta-2		DR*13:02	W B					W B				
LLVFATDDGFHFAG	6 P05107	Integrin beta-2		DR*13:02	W B					W B				
LLVFATDDGFHFAGDG	4 P05107	Integrin beta-2		DR*03:01	W B					W B				
AENNIQPIFAVTSRM	2 P05107	Integrin beta-2		DR*13:02								W B		
GGPQFVADHPFLF	2 P05120	Plasminogen activator inhibitor 2		DR*03:01	W B					W B				
GPQFVADHPFLF	1 P05120	Plasminogen activator inhibitor 2		DR*13:05	W B									
GGPQFVADHPFLF	2 P05120	Plasminogen activator inhibitor 2		DR*15:01	W B					W B				
KDEISTTDAIFVQ	1 P05121	Plasminogen activator inhibitor 1		DR*04:04										SB
VAAAISKTAVAPIE	1 P05141	ADP/ATP translocase 2		DR*07:01				SB						
VSNEIVRFPTDQLTPDQ	2 P05164	Myeloperoxidase		DR*13:02									W B B	
VSNEIVRFPTDQLTPDQ	2 P05164	Myeloperoxidase		DR*13:02									W B B	
VSNEIVRFPTDQLTPD	2 P05164	Myeloperoxidase		DR*03:01			SB SB							

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad										
				1	2	3	7	12	14	21	22			
VSNEIVRFPTDQLTPD	2 P05164	Myeloperoxidase				W B	W B							
DKDVIAINQDPLGKQG	3 P06280	Alpha-galactosidase A	1	1	W B	W B								
DKDVIAINQDPLGKQG	3 P06280	Alpha-galactosidase A	1	1	W B	W B								
ADQLRTQVNTQAEQ	2 P06727	Apolipoprotein A-IV											SB	
DQLRTQVNTQAEQ	2 P06727	Apolipoprotein A-IV											SB	
DQLRTQVNTQAEQL	1 P06727	Apolipoprotein A-IV											SB	
ADQLRTQVNTQAE	1 P06727	Apolipoprotein A-IV											SB	
NSEVILPVPFNVINGG	1 P06733	Alpha-enolase	1	90										SB
GNSEVILPVPFNVINGGS H	2 P06733	Alpha-enolase	1	90		SB		SB						
DKVVIGMDVAASEF	2 P06733	Alpha-enolase	1	90				SB						
DKVVIGMDVAASE	2 P06733	Alpha-enolase	1	90				SB						
TDKVVIGMDVAASE	2 P06733	Alpha-enolase	1	90				SB						
TDKVVIGMDVAASE	2 P06733	Alpha-enolase	1	90				SB						
TDKVVIGMDVAASEFF	2 P06733	Alpha-enolase	1	90				SB						
TDKVVIGMDVAASEFF	4 P06733	Alpha-enolase	1	90				SB						
TDKVVIGMDVAASEF	1 P06733	Alpha-enolase	1	90				SB						
DKVVIGMDVAASEFF	2 P06733	Alpha-enolase	1	90				SB						
DKVVIGMDVAASEF	2 P06733	Alpha-enolase	1	90				SB						
GNSEVILPVPFNVINGGS H	2 P06733	Alpha-enolase	1	90		W B		W B						
TPILVDGKDVMPVVK	1 P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	8	27	SB									
TPILVDGKDVMPVVK	1 P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	8	27	SB									
NTPILVDGKDVMPVVK	1 P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	8	27	SB	SB								
SNTPILVDGKDVMPVVK	2 P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	8	27	SB									
SNTPILVDGKDVMPVVK	2 P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	8	27	SB	SB								
TPILVDGKDVMPVVK	1 P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	8	27	SB									
NTPILVDGKDVMPVVK	1 P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	8	27	SB									
NTPILVDGKDVMPVVK	1 P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	8	27	W B	W B								
SNTPILVDGKDVMPVVK	2 P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	8	27	W B	W B								
IPVIEPSVPELVVVKP	2 P07333	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor												W B

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad												
			MCF-7												
				1	2	3	7	12	14	21	22				
PSM	Peptid PSM	DR*03:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01
IPVIEPSVPELVVK	2 P07333	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor						SB	SB			SB	SB		
IPVIEPSVPELVVKPG	2 P07333	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor						SB	SB			SB	SB		
IPVIEPSVPELVVK	2 P07333	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor						W	W			W	W		
								B	B			B	B		
IPVIEPSVPELVVKPG	2 P07333	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor						W	W			W	W		
								B	B			B	B		
IPVIEPSVPELVVK	2 P07333	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor						W	W			W	W		
								B	B			B	B		
IPVIEPSVPELVVKPG	2 P07333	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor						W	W			W	W		
								B	B			B	B		
IPVIEPSVPELVVK	2 P07333	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor						W	W			W	W		
								B	B			B	B		
IPVIEPSVPELVVKPG	2 P07333	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor						W	W			W	W		
								B	B			B	B		
AYPRISVNNVLPVFDNL	7 P07339	Cathepsin D	8	41				W	W					W	W
								B	B					B	B
AYPRISVNNVLPVFDN	2 P07339	Cathepsin D	8	41	W	W		W	W			W	W	W	W
	2				B	B		B	B			B	B	B	B
YPRISVNNVLPVFDNL	5 P07339	Cathepsin D	8	41				W	W					W	W
								B	B					B	B
YPRISVNNVLPVFDN	1 P07339	Cathepsin D	8	41	W	W		W	W			W	W	W	W
	7				B	B		B	B			B	B	B	B
AYPRISVNNVLPVFDNL	7 P07339	Cathepsin D	8	41				SB	SB					SB	SB
YPRISVNNVLPVFDNLM	2 P07339	Cathepsin D	8	41											SB
AYPRISVNNVLPVFDN	2 P07339	Cathepsin D	8	41	SB	SB		SB	SB	SB		SB	SB	SB	SB
	2														
YPRISVNNVLPVFDNL	5 P07339	Cathepsin D	8	41				SB	SB					SB	SB
YPRISVNNVLPVFDN	1 P07339	Cathepsin D	8	41	SB	SB		SB	SB			SB	SB	SB	SB
	7														
AYPRISVNNVLPV	3 P07339	Cathepsin D	8	41				SB	SB						SB
AYPRISVNNVLPVFDN	2 P07339	Cathepsin D	8	41	W	W		W	W			W	W	W	W
	2				B	B		B	B			B	B	B	B
YPRISVNNVLPVFDN	1 P07339	Cathepsin D	8	41	W	W		W	W			W	W	W	W
	7				B	B		B	B			B	B	B	B
AYPRISVNNVLPVFDN	2 P07339	Cathepsin D	8	41	W	W		W	W			W	W	W	W
	2				B	B		B	B			B	B	B	B
YPRISVNNVLPVFDN	1 P07339	Cathepsin D	8	41	W	W		W	W			W	W	W	W
	7				B	B		B	B			B	B	B	B
AYPRISVNNVLPVFDN	2 P07339	Cathepsin D	8	41	SB	SB		SB	SB	SB		SB	SB	SB	SB
	2														

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad									
				PSM									
				1	2	3	7	12	14	21	22		
YPRISVNNVLPVFDN	1 7 P07339	Cathepsin D	8 41	SB	SB		SB	SB		SB	SB		
AYPRISVNNVLPVFDNL	7 P07339	Cathepsin D	8 41				SB	SB			SB SB		
AYPRISVNNVLPVFD	8 P07339	Cathepsin D	8 41				SB	SB		SB			
YPRISVNNVLPVFD	8 P07339	Cathepsin D	8 41				SB	SB					
MAYPRISVNNVLPVFDNL	3 P07339	Cathepsin D	8 41				SB						
YPRISVNNVLPVFDNL	5 P07339	Cathepsin D	8 41				SB	SB			SB SB		
YPRISVNNVLPVF	6 P07339	Cathepsin D	8 41				SB	SB		SB			
AYPRISVNNVLPVF	2 P07339	Cathepsin D	8 41				SB	SB					
AYPRISVNNVLPV	3 P07339	Cathepsin D	8 41				SB	SB			SB		
AYPRISVNNVLPVFDN	2 2 P07339	Cathepsin D	8 41	SB	SB		SB	SB	SB	SB	SB SB		
YPRISVNNVLPVFDN	1 7 P07339	Cathepsin D	8 41	SB	SB		SB	SB		SB	SB SB		
AYPRISVNNVLPVFDNL	7 P07339	Cathepsin D	8 41				SB	SB			SB SB		
AYPRISVNNVLPVFD	8 P07339	Cathepsin D	8 41				SB	SB		SB			
YPRISVNNVLPVFD	8 P07339	Cathepsin D	8 41				SB	SB					
YPRISVNNVLPVFDNL	5 P07339	Cathepsin D	8 41				SB	SB			SB SB		
MAYPRISVNNVLPVFDNLM	2 P07339	Cathepsin D	8 41					SB					
YPRISVNNVLPVF	6 P07339	Cathepsin D	8 41				SB	SB		SB			
AYPRISVNNVLPVF	2 P07339	Cathepsin D	8 41				SB	SB					
AYPRISVNNVLPV	3 P07339	Cathepsin D	8 41				SB	SB			SB		
MAYPRISVNNVLPVFDN	2 P07339	Cathepsin D	8 41					SB					
AYPRISVNNVLPVFDN	2 2 P07339	Cathepsin D	8 41	W B	W B		W B	W B	W B	W B	W B		
AYPRISVNNVLPVFDN	2 2 P07339	Cathepsin D	8 41	SB	SB		SB	SB	SB	SB	SB SB		
YPRISVNNVLPVFDN	1 7 P07339	Cathepsin D	8 41	SB	SB		SB	SB		SB	SB SB		
AYPRISVNNVLPVFD	8 P07339	Cathepsin D	8 41				SB	SB		SB			
YPRISVNNVLPVF	6 P07339	Cathepsin D	8 41				SB	SB		SB			
YYIQDQTKGDYQK	2 P07355	Annexin A2	1 61 8	SB									
YYIQDQTKGDYQKA	1 P07355	Annexin A2	1 61 8	SB									
YIQDQTKGDYQK	1 P07355	Annexin A2	1 61 8	SB									
VDEVTIVNILTNRNSNAQ	6 P07355	Annexin A2	1 61 8				SB	SB					
GVDEVTIVNILTNRNSNAQ	5 P07355	Annexin A2	1 61 8				SB						
VDEVTIVNILTNRNSN	2 P07355	Annexin A2	1 61 8				SB						

Secuencia	Identificador	Descripción	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad																
				Peptid PSM	1		2		3		7		12		14		21		22	
					DR*E3:01	DR*E3:01	DR*E3:05	DR*E5:01	DR*E4:04	DR*E3:02	DR*E7:01	DR*E3:02	DR*E3:01	DR*E3:03	DR*E1:02	DR*E3:02	DR*E3:01	DR*E3:02	DR*E3:01	DR*E3:02
EVTIVNILTNRNSNAQ	3 P07355	Annexin A2	1 61 8					SB	SB											
EVTIVNILTNRNSN	2 P07355	Annexin A2	1 61 8					SB												
VDEVTVNILTNRNSNA	2 P07355	Annexin A2	1 61 8					SB												
EVTIVNILTNRNSNA	2 P07355	Annexin A2	1 61 8					SB	SB											
DEVTIVNILTNRNS	1 P07355	Annexin A2	1 61 8					SB												
VDEVTVNILTNRNSNAQ	6 P07355	Annexin A2	1 61 8					W B	W B											
EVTIVNILTNRNSNAQ	3 P07355	Annexin A2	1 61 8					W B	W B											
EVTIVNILTNRNSNA	2 P07355	Annexin A2	1 61 8					W B	W B											
SNPQFIVDGA TRTDI	4 P07384	Calpain-1 catalytic subunit	8 13	SB													SB			
SNPQFIVDGA TRTD	1 P07384	Calpain-1 catalytic subunit	8 13														SB			
SNPQFIVDGA TRTDI	4 P07384	Calpain-1 catalytic subunit	8 13	W B													W B			
GDSLQLDRISVYYNEA	1 P07437	Tubulin beta chain	1 96 0										SB							
EVVAPFMANIPLLLYPQ	1 P07602	Prosaposin	1 32 0						W B	W B										
EVVAPFMANIPLLLYPQ	1 P07602	Prosaposin	1 32 0					SB	SB											
TVGPISVAIDAGHESFL	1 P07711	Cathepsin L1											W B							
DSLLQDGEFSMDLR	2 P07737	Profilin-1	4 20	W B																
KEVIPVNVPEAQEE	2 P07814	Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase	1 21 1					SB												
YNSYSVSNSEKDIM	2 P07858	Cathepsin B											W B				W B			
SGVYQHVTGEMM	5 P07858	Cathepsin B							W B								W B			
SGVYQHVTGEMMG	2 P07858	Cathepsin B						SB									SB			
GPVEGAFSVYSDFLLYKSG	3 P07858	Cathepsin B						SB												
GPVEGAFSVYSDFLLYK	2 P07858	Cathepsin B						SB												
GAFSVYSDFLLYK	2 P07858	Cathepsin B						SB												
GPVEGAFSVYSDFLLYKS	2 P07858	Cathepsin B						SB												
GAFSVYSDFLLYKS	1 P07858	Cathepsin B						SB												
SGVYQHVTGEMM	5 P07858	Cathepsin B							W B								W B			
SGVYQHVTGEMMG	2 P07858	Cathepsin B						SB									SB			
YNSYSVSNSEKDIMA	2 P07858	Cathepsin B											SB							
YNSYSVSNSEKDIMAE	2 P07858	Cathepsin B											W B							
GYNSYSVSNSEKDIMAE	2 P07858	Cathepsin B											W B							

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad													
			PSM	MCF-7												
				1	2	3	7	12	14	21	22					
Péptid PSM	DR*03/01	DR*13/01	DR*13/05	DR*15/01	DR*04/04	DR*13/02	DR*07/01	DR*13/02	DR*03/01	DR*13/03	DR*01/02	DR*13/02	DR*13/01	DR*13/02	DR*07/01	
GYNSYSVSNSEKDIMA	2 P07858	Cathepsin B										SB				
YNSYSVSNSEKDIM	2 P07858	Cathepsin B											W B			W B
YNSYSVSNSEKDI	2 P07858	Cathepsin B											W B			
GYNSYSVSNSEKDI	2 P07858	Cathepsin B											W B			
GYNSYSVSNSEKDIMAE	2 P07858	Cathepsin B											W B			
GYNSYSVSNSEKDIM	1 P07858	Cathepsin B											W B			
YVYNVDQRDTMDMG	1 P07996	Thrombospondin-1											W B	W B		
YVYNVDQRDTMDMG	1 P07996	Thrombospondin-1											SB	SB		
TDLLQIDPNFGSK	2 P08195	4F2 cell-surface antigen heavy chain	1	1						SB	SB					
TGALYRIGDLQAFQG	4 P08195	4F2 cell-surface antigen heavy chain	1	1						SB						
GALYRIGDLQAFQG	1 P08195	4F2 cell-surface antigen heavy chain	1	1						SB						
TDLLQIDPNFGSK	2 P08195	4F2 cell-surface antigen heavy chain	1	1						W B	W B					
EIVDAITTTAQSHQ	1 P08237	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type								SB						
VSGTLVLLQGARGFA	2 P08571	Monocyte differentiation antigen CD14													SB	
SVGSGTLVLLQGARGFA	1 P08571	Monocyte differentiation antigen CD14													SB	
SPGGVYATRSSAV	8 P08670	Vimentin									SB					SB
SPGGVYATRSSAV	8 P08670	Vimentin									SB					SB
DSVDFSLADAINTEFKN	2 P08670	Vimentin												W B		
LPLFVGSVRNPNS	2 P08697	Alpha-2-antiplasmin												SB		
DGDLTLYQSNLILR	2 P09211	Glutathione S-transferase P													SB	
LPGQLKPFETLLSQNQG	2 P09211	Glutathione S-transferase P													SB	
ALPGQLKPFETLLSQNQG	1 P09211	Glutathione S-transferase P													SB	
LPGQLKPFETLLSQNQ	1 P09211	Glutathione S-transferase P													SB	
GEVAPDAKSFVLNLG	2 P09382	Galectin-1	1	3	SB									SB		
GEVAPDAKSFVLNLG	2 P09382	Galectin-1	1	3	SB									SB		
NPMAYVMEKAGGMAT	1 P09467	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	5	16												W B
GHPQYLLDSNSWIEE	5 P0C0L4	Complement C4-A												W B		W B
HPQYLLDSNSWIEE	2 P0C0L4	Complement C4-A												W B		W B
SARPVAFSVVPTAAAAVS	2 P0C0L4	Complement C4-A													SB	

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	PSM	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad												
					1	2	3	7	12	14	21	22					
Peptid PSM	DR*13:01	DR*13:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01		
EQTMIYLAPTLAASRY	2 P0C0L4	Complement C4-A						SB	SB								
SPSVVHLGVPLSVG	3 P0C0L4	Complement C4-A						W	B								
GEQTMIVLAPTLAASRYL	1 P0C0L4	Complement C4-A						SB									
SPSVVHLGVPLSVGVQ	3 P0C0L4	Complement C4-A						W	B								
EQTMIYLAPTLAASRY	1 P0C0L4	Complement C4-A						SB	SB								
FSPSVVHLGVPLSVGVQ	2 P0C0L4	Complement C4-A						W	B								
ARPVAFSVVPTAAAAVS	1 P0C0L4	Complement C4-A						SB	SB								
FSPSVVHLGVPLSVG	1 P0C0L4	Complement C4-A						W	B								
EQTMIYLAPTLAASRY	2 P0C0L4	Complement C4-A						W	B	W	B						
EQTMIYLAPTLAASRY	1 P0C0L4	Complement C4-A						W	B	W	B						
ARPVAFSVVPTAAAAVS	1 P0C0L4	Complement C4-A						W	B	W	B						
GLEEELQFSLGSKIN	1 P0C0L4	Complement C4-A								SB							
GHPQYLLDSNSWIEE	5 P0C0L4	Complement C4-A					W	B				W	B				
HPQYLLDSNSWIEE	2 P0C0L4	Complement C4-A					W	B				W	B				
LQALVREMSGSPASGIPV	1 P0C0L4	Complement C4-A												W	B		
NMGITDLQGLRLYYA	1 P0C0L4	Complement C4-A												SB			
DAAKNQVALNPQNTVFDA	3 P0DMV9;P0DMV8	Heat shock 70 kDa protein 1B										SB				SB	
DAAKNQVALNPQNTVFD	3 P0DMV9;P0DMV8	Heat shock 70 kDa protein 1B										SB				SB	
DAAKNQVALNPQNTVFDA	3 P0DMV9;P0DMV8	Heat shock 70 kDa protein 1B										SB				SB	
DAAKNQVALNPQNTVFD	3 P0DMV9;P0DMV8	Heat shock 70 kDa protein 1B										SB				SB	
EVISWLDANTLAEK	1 P0DMV9;P0DMV8	Heat shock 70 kDa protein 1B												SB			
TPSYVAFTDTERL	5 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)								W	B					W	B
TPSYVAFTDTERLIG	3 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)										SB					SB
TPSYVAFTDTERLIGDA	2 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)								W	B					W	B
VPAYFNDSQRQAT	2 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)					W	B				W	B	W	B		
NVLRRIINEPTAAAAYG	2 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)										SB					
LNVLRIINEPTAAAAYG	2 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)										SB					
LNVLRIINEPTAAA	2 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)										SB					
NVLRRIINEPTAAAIA	4 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)										SB	SB				
VLRRIINEPTAAAIA	1 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)										SB	SB				
VLRRIINEPTAAAIA	2 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)										SB	SB				

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	PSM	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad															
					Péptid PSM															
						1	2	3	7	12	14	21	22							
GLNVLRIINEPTAAA	1 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)	2				SB													
LNVLRIINEPTAAAI	2 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)	2				SB SB													
GLNVLRIINEPTAAAIAYG	1 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)	2				SB													
NVLRIINEPTAAAAIA	4 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)	2				W B	W B												
VLRIINEPTAAAIAY	1 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)	2				W B	W B												
VLRIINEPTAAAAIA	2 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)	2				W B	W B												
LNVLRIINEPTAAAI	2 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)	2				W B	W B												
TPSYVAFDTERL	5 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)	2					W B												W B
TPSYVAFDTERLIG	3 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)	2					SB												SB
TPSYVAFDTERLIGDA	2 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)	2					W B												W B
TTPSYVAFDTERL	2 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)	2					W B												
VPAYFNDSQRQAT	2 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)	2			W B				W B	W B									
LNKSINPDEAVAYG	1 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)	2								SB SB									
VPAYFNDSQRQAT	2 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)	2			W B				W B	W B									
LNKSINPDEAVAYG	1 P0DMV9;P0DMV8;P1114	Heat shock protein (several)	2								W B	W B								
VAVISYDGSNKYYADSV	3 P0DP02	Immunoglobulin heavy variable 3-30-3				SB					SB SB									
VAVISYDGSNKYYADS	4 P0DP02	Immunoglobulin heavy variable 3-30-3				SB SB					SB SB									
VAVISYDGSNKYYAD	2 P0DP02	Immunoglobulin heavy variable 3-30-3				SB SB														
VAVISYDGSNKYYADS	4 P0DP02	Immunoglobulin heavy variable 3-30-3				W B	W B				W B	W B								
VAVISYDGSNKYYAD	2 P0DP02	Immunoglobulin heavy variable 3-30-3				W B	W B													
VAVISYDGSNKYYADSV	3 P0DP02	Immunoglobulin heavy variable 3-30-3				SB					SB SB									
VAVISYDGSNKYYADS	4 P0DP02	Immunoglobulin heavy variable 3-30-3				SB SB					SB SB									
VAVISYDGSNKYYADSV	3 P0DP02	Immunoglobulin heavy variable 3-30-3				W B					W B	W B								
VAVISYDGSNKYYADS	4 P0DP02	Immunoglobulin heavy variable 3-30-3				W B	W B				W B	W B								
IPARLDILDTAGQEE	1 P10301	Ras-related protein R-Ras									SB									
ELNGAYKAIPVAQDLNAPS	2 P10451	Osteopontin																		SB
LNGAYKAIPVAQDLNAPS	2 P10451	Osteopontin																		SB
LNGAYKAIPVAQDLNAP	2 P10451	Osteopontin																		SB
SEELNGAYKAIPVAQDLNA PSD	2 P10451	Osteopontin																		SB
SEELNGAYKAIPVAQDLNA PS	2 P10451	Osteopontin																		SB
NGAYKAIPVAQDLNAP	1 P10451	Osteopontin																		SB

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad										
			PSM	MCF-7									
				1	2	3	7	12	14	21	22		
GAYKAIPVAQDLNAP	1 P10451	Osteopontin										SB	
EVARIVGNSGLNIYNLY	4 P10619	Lysosomal protective protein	4	5						SB			SB
EVARIVGNSGLNIYNL	6 P10619	Lysosomal protective protein	4	5						SB			SB
EVARIVGNSGLNIYN	5 P10619	Lysosomal protective protein	4	5				SB	SB				SB
VARIVGNSGLNIYNL	3 P10619	Lysosomal protective protein	4	5						SB			SB
VARIVGNSGLNIYN	3 P10619	Lysosomal protective protein	4	5						SB			SB
EVARIVGNSGLNIY	3 P10619	Lysosomal protective protein	4	5						SB			SB
EKDTVVVQDLGNIFT	2 P10619	Lysosomal protective protein	4	5	W	B							
YEKDTVVVQDLGNIFT	5 P10619	Lysosomal protective protein	4	5	W	B							
KDTVVVQDLGNIFT	3 P10619	Lysosomal protective protein	4	5	W	B							
EVARIVGNSGLNIYN	5 P10619	Lysosomal protective protein	4	5				SB	SB				SB
EVARIVGNSGLNIYN	5 P10619	Lysosomal protective protein	4	5				SB	SB				SB
EVARIVGNSGLNIYNL	6 P10619	Lysosomal protective protein	4	5						SB			SB
VARIVGNSGLNIYN	3 P10619	Lysosomal protective protein	4	5						SB			SB
EVARIVGNSGLNIYNLY	4 P10619	Lysosomal protective protein	4	5						SB			SB
EVARIVGNSGLNIY	3 P10619	Lysosomal protective protein	4	5						SB			SB
VARIVGNSGLNIYNL	3 P10619	Lysosomal protective protein	4	5						SB			SB
DGFVQDEGTMFPVVGK	2 P10643	Complement component C7										W	B
ISAEVYTEEDAASYVR	2 P10644	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	2	2				SB					
TPEEIAQVATISANGDK	2 P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	1	41				SB					
DQTVSDNELQEMSNQGSKY	3 P10909	Clusterin	1	1				SB					
DQTVSDNELQEMSNQGSK	2 P10909	Clusterin	1	1				SB					
SDNELQEMSNQGSKY	2 P10909	Clusterin	1	1				SB					
DQTVSDNELQEMSNQGSK	2 P10909	Clusterin	1	1				W	B				
TVSDNELQEMSNQGSKY	2 P10909	Clusterin	1	1				SB					
SDNELQEMSNQGSK	2 P10909	Clusterin	1	1				SB					
SDNELQEMSNQGSKY	6 P10909	Clusterin	1	1				SB					
VSDNELQEMSNQGSKY	3 P10909	Clusterin	1	1				SB					
DNELQEMSNQGSKY	2 P10909	Clusterin	1	1				SB					
DNELQEMSNQGSKY	2 P10909	Clusterin	1	1				SB					

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad														
			MCF-7														
				1	2	3	7	12	14	21	22						
			Péptid	DR*03301	DR*13301	DR*13305	DR*15301	DR*04304	DR*13302	DR*07301	DR*13302	DR*03301	DR*13303	DR*01302	DR*13301	DR*13302	DR*07301
			PSM														
TVSDNELQEMSNQGSKY	2 P10909	Clusterin	1	1				SB									
VSDNELQEMSNQGSKY	2 P10909	Clusterin	1	1				SB									
DQTVSDNELQEMSNQGSK YVN	2 P10909	Clusterin	1	1				W B									
SDNELQEMSNQGSK	4 P10909	Clusterin	1	1				SB									
DNELQEMSNQGSK	2 P10909	Clusterin	1	1				SB									
DQTVSDNELQEMSNQGSK	3 P10909	Clusterin	1	1				W B									
DQTVSDNELQEMSNQGSK YVN	1 P10909	Clusterin	1	1				W B									
NELQEMSNQGSKY	2 P10909	Clusterin	1	1				SB									
NELQEMSNQGSKY	2 P10909	Clusterin	1	1				SB									
VSDNELQEMSNQGSKYVN	1 P10909	Clusterin	1	1				SB									
VSDNELQEMSNQGSKYVN	2 P10909	Clusterin	1	1				SB									
DQTVSDNELQEMSNQGSK YVNKE	2 P10909	Clusterin	1	1				SB									
TVSDNELQEMSNQGSKYV N	1 P10909	Clusterin	1	1				SB									
NVMRIINEPTAAAIAYG	2 P11021	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	1	65				SB									
KSQIFSTASDNQPT	2 P11021	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	1	65				SB									
NVMRIINEPTAAAILA	1 P11021	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	1	65				SB	SB								
VMRIINEPTAAAILA	1 P11021	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	1	65				SB	SB								
NVMRIINEPTAAAILA	1 P11021	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	1	65				W B	W B								
VMRIINEPTAAAILA	1 P11021	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	1	65				W B	W B								
VEIHANDQGNRITPS	2 P11021	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	1	65						SB							
RIINEPTAAAIAYG	1 P11021;P0DMV9;P0DMV 8;P11142	Endoplasmic reticulum chaperone BiP; Heat shock protein (several)						SB									
KNQVAMNPNTVFD	6 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2	10				W B	W B	W B					W B	W B	
DAAKNQVAMNPNTVFD A	9 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2	10	SB			SB	SB	SB						SB	
AAKNQVAMNPNTVFD	2 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2	10						SB							SB
AAKNQVAMNPNTVFD	3 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2	10						SB							SB
KNQVAMNPNTVFD	6 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2	10				SB	SB	SB					SB	SB	
DAAKNQVAMNPNTVFD A	9 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2	10	W B			W B	W B	W B						W B	
DAAKNQVAMNPNTVFD	6 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2	10	W B				W B	W B							
DAAKNQVAMNPNTVFD AK	4 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2	10	W B												
DAAKNQVAMNPNTVFD A	9 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2	10	W B			W B	W B	W B						W B	

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	PSM	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad										
					1	2	3	7	12	14	21	22			
AKNQVAMNPNTVFD	6 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6				W B	W B	W B						
KNQVAMNPNTVFD	6 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6				W B	W B	W B				W B	W B	
GILNVSVDKSTGKE	2 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6				W B								
AKNQVAMNPNTVFD	4 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6				W B	W B	W B						
GILNVSVDKSTG	1 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6				W B								
DAAKNQVAMNPNTVFD A	2 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6	W B			W B	W B	W B				W B		
AKNQVAMNPNTVFD	2 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6				W B	W B	W B						
KNQVAMNPNTVFD	3 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6				W B	W B	W B						
DAAKNQVAMNPNTVFD A	9 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6	SB			SB	SB	SB					SB	
DAAKNQVAMNPNTVFD	6 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6	SB				SB	SB						
AKNQVAMNPNTVFD	6 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6				SB	SB	SB						
KNQVAMNPNTVFD	6 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6				SB	SB	SB				SB	SB	
AKNQVAMNPNTVFD	4 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6				SB	SB	SB						
DAAKNQVAMNPNTVFD A	2 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6	SB			SB	SB	SB					SB	
AKNQVAMNPNTVFD	2 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6				SB	SB	SB						
KNQVAMNPNTVFD	3 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6				SB	SB	SB						
DAAKNQVAMNPNTVFD A	9 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6	SB			SB	SB	SB					SB	
DAAKNQVAMNPNTVFD	6 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6	SB				SB	SB						
AKNQVAMNPNTVFD	6 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6				SB	SB	SB						
KNQVAMNPNTVFD	6 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6				SB	SB	SB				SB	SB	
AKNQVAMNPNTVFD	4 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6				SB	SB	SB						
AAKNQVAMNPNTVFD	3 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6						SB					SB	
AAKNQVAMNPNTVFD	2 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6						SB					SB	
KNQVAMNPNTVFD	3 P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	2 10 1 6				SB	SB	SB						
IAQVFLDSIMGNKD	1 P11166	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1						SB							
APQEIVAANQRGSLYQ	2 P11215	Integrin alpha-M												W B	
SDIAFLIDGSGSIIPH	7 P11215	Integrin alpha-M				W B				W B	W B			W B	
APQEIVAANQRGSLYQ	2 P11215	Integrin alpha-M												W B	
DSDIAFLIDGSGSIIPHD	1 3 P11215	Integrin alpha-M				W B				W B					
EDSDIAFLIDGSGSIIPH	9 P11215	Integrin alpha-M				W B				W B					

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	PSM	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad														
					1	2	3	7	12	14	21	22							
				Péptid PSM	DR*03/01	DR*13/01	DR*13/05	DR*15/01	DR*04/04	DR*13/02	DR*07/01	DR*13/02	DR*03/01	DR*13/03	DR*01/02	DR*13/02	DR*13/01	DR*13/02	DR*07/01
SDIAFLIDGSGSIIPIH	7 P11215	Integrin alpha-M			W B							W B	W B					W B	
DIAFLIDGSGSIIPIHD	3 P11215	Integrin alpha-M			W B							W B							
SDIAFLIDGSGSIIPIHD	2 P11215	Integrin alpha-M			W B							W B							
NLDTENAMTFQENARGFG QSV	2 P11215	Integrin alpha-M										W B							
ENAMTFQENARGFGQ	2 P11215	Integrin alpha-M																	SB
LDTENAMTFQENARGFGQ SV	2 P11215	Integrin alpha-M										W B							
NLDTENAMTFQENARGFG Q	2 P11215	Integrin alpha-M																	SB
NLDTENAMTFQENARGFG QSV	2 P11215	Integrin alpha-M										W B							
FNLDTENAMTFQENARGF GQSV	2 P11215	Integrin alpha-M										W B							
LDTENAMTFQENARGFGQ S	2 P11215	Integrin alpha-M																	SB
TENAMTFQENARGFGQ	2 P11215	Integrin alpha-M																	SB
DTENAMTFQENARGFG	2 P11215	Integrin alpha-M																	SB
TENAMTFQENARGFGQS	3 P11215	Integrin alpha-M																	SB
FNLDTENAMTFQENARGF GQSV	2 P11215	Integrin alpha-M										W B							
LDTENAMTFQENARGFGQ	2 P11215	Integrin alpha-M																	SB
LDTENAMTFQENARGFGQ SV	2 P11215	Integrin alpha-M										W B							
TENAMTFQENARGFGQS	2 P11215	Integrin alpha-M																	SB
TENAMTFQENARGFGQSV	2 P11215	Integrin alpha-M																	SB
LDTENAMTFQENARGFGQ S	2 P11215	Integrin alpha-M																	SB
TENAMTFQENARGFGQ	2 P11215	Integrin alpha-M																	SB
DTENAMTFQENARGFGQ	2 P11215	Integrin alpha-M																	SB
TENAMTFQENARGFGQSV	2 P11215	Integrin alpha-M																	SB
NLDTENAMTFQENARGFG Q	1 P11215	Integrin alpha-M																	SB
DTENAMTFQENARGFGQS	2 P11215	Integrin alpha-M																	SB
ENAMTFQENARGFG	4 P11215	Integrin alpha-M																	SB
DTENAMTFQENARGFGQ	2 P11215	Integrin alpha-M																	SB
LDTENAMTFQENARGFGQ	2 P11215	Integrin alpha-M																	SB
LDTENAMTFQENARGFG	2 P11215	Integrin alpha-M																	SB
ENAMTFQENARGFGQ	2 P11215	Integrin alpha-M																	SB
LDTENAMTFQENARGFG	1 P11215	Integrin alpha-M																	SB
DTENAMTFQENARGFG	2 P11215	Integrin alpha-M																	SB

Secuencia	Identificador	Descripción	PSM	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad															
				MCF-7	1	2	3	7	12	14	21	22							
				Peptid	DR*03:01	DR*13:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01
FNLDTENAMTFQENARGF GQSVVQ	4	P11215	Integrin alpha-M						W B										
ENAMTFQENARGFG	1 0	P11215	Integrin alpha-M						SB										
DTENAMTFQENARGFGQ V	1	P11215	Integrin alpha-M						SB										
TENAMTFQENARGFG	4	P11215	Integrin alpha-M						SB										
ENAMTFQENARGFGQS	1	P11215	Integrin alpha-M						SB										
ENAMTFQENARG	1	P11215	Integrin alpha-M						W B										
TENAMTFQENARGFG	1	P11215	Integrin alpha-M						SB										
NAMTFQENARGFG	1	P11215	Integrin alpha-M						SB										
NAMTFQENARGFGQ	1	P11215	Integrin alpha-M						SB										
SDMNDAYLGAAAAHLR	2	P11215	Integrin alpha-M							W B									
NDAYLGAAAAHLR	1	P11215	Integrin alpha-M							W B									
SDMNDAYLGAAAAHLRN	2	P11215	Integrin alpha-M							W B									
DMNDAYLGAAAAHLR	1	P11215	Integrin alpha-M							W B									
GAVYLFHGTSGSGISPS	1	P11215	Integrin alpha-M								SB								
DSDIAFLIDGSGSIIPHD	1 3	P11215	Integrin alpha-M		W B							W B							
EDSDIAFLIDGSGSIIPH	9	P11215	Integrin alpha-M		W B							W B							
S DIAFLIDGSGSIIPH	7	P11215	Integrin alpha-M		W B							W B	W B					W B	
DIAFLIDGSGSIIPHD	3	P11215	Integrin alpha-M		W B							W B							
S DIAFLIDGSGSIIPHD	2	P11215	Integrin alpha-M		W B							W B							
IAFLIDGSGSIIPH	1	P11215	Integrin alpha-M									W B							
S DIAFLIDGSGSIIPH	7	P11215	Integrin alpha-M		W B							W B	W B					W B	
GFGQSVVQLQGSRVVVG PQ	1	P11215	Integrin alpha-M												SB				
GFGQSVVQLQGSRVVVG PQE	2	P11215	Integrin alpha-M												SB				
FGQSVVQLQGSRVVVG	2	P11215	Integrin alpha-M												SB				
GFGQSVVQLQGSRVVVG	1	P11215	Integrin alpha-M												SB				
GFGQSVVQLQGSRVVVG PQEIVA	2	P11215	Integrin alpha-M												SB				
GQSVVQLQGSRVVVGAPQ	2	P11215	Integrin alpha-M												SB				
GQSVVQLQGSRVVVG	1	P11215	Integrin alpha-M												SB	SB			
QSVVQLQGSRVVVGAPQ	1	P11215	Integrin alpha-M												SB				
GQSVVQLQGSRVVVG	1	P11215	Integrin alpha-M												W B	W B			

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad																	
			MCF-7		1	2	3	7	12	14	21	22								
	PSM		Péptid	PSM	DR*03/01	DR*13/01	DR*13/05	DR*15/01	DR*04/04	DR*13/02	DR*07/01	DR*13/02	DR*03/01	DR*13/03	DR*01/02	DR*13/02	DR*13/01	DR*13/02	DR*07/01	
LN'TILPDARDPAF	3 P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	2	4	SB							SB	SB							
GIQLN'TILPDARDPAF	1 P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	2	4	SB															
NTILPDARDPAFK	1 P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	2	4	SB	SB														
LN'TILPDARDPAFK	2 P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	2	4	SB	SB														
IQLN'TILPDARDPAF	1 P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	2	4	SB															
NTILPDARDPA	1 P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	2	4	W	B														
NTILPDARDPAFK	1 P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	2	4	W	W	B	B												
LN'TILPDARDPAFK	2 P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	2	4	W	W	B	B												
EIKTVESITDIRADID	2 P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	2	4					SB											
LN'TILPDARDPAF	3 P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	2	4	SB							SB	SB							
LN'TILPDARDPAF	3 P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	2	4	W	B						W	W	B	B					
FTEVVSISNLGMAK	1 P11717	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	1	1				SB												
DLNPLIKLSGAYLVDDS	1 P11717	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	1	1												SB	SB			
DLNPLIKLSGAYLVDDS	1 P11717	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	1	1												SB	SB			
NIGYTLFSSKPVT	2 P12318	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-a									SB									SB

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad															
			PSM	MCF-7														
				1	2	3	7	12	14	21	22							
			Peptid PSM	DR*03:01	DR*13:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01
NIGYTLFSSKPVT	2 P12318	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-a							SB									SB
GNIGYTLFSSKPVT	2 P12318	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-a								SB								
GNIGYTLFSSKPVITI	1 P12318	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-a								SB	SB							
GNIGYTLFSSKPVITI	1 P12318	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-a								W B	W B							
NTFLRITFANVVN	1 P12724	Eosinophil cationic protein									SB							
LNTAFDVAEKYLDIPK	2 P12814	Alpha-actinin-1	1 75 9										SB					
EKYAVDDVQYVD	1 P12955	Xaa-Pro dipeptidase	1 1 W B															
EKYAVDDVQYVDE	2 P12955	Xaa-Pro dipeptidase	1 1									W B	W B					
EKYAVDDVQYVDE	2 P12955	Xaa-Pro dipeptidase	1 1									W B	W B					
ADGISSTFSQRIEG	4 P13612	Integrin alpha-4									SB	SB						SB
ADGISSTFSQRIEG	4 P13612	Integrin alpha-4									SB	SB						SB
ADGISSTFSQRIE	1 P13612	Integrin alpha-4									SB							
ADGISSTFSQRIEG	4 P13612	Integrin alpha-4									W B	W B						W B
FQRIVENNVIIISTY	1 P13639	Elongation factor 2	1 63 5															SB
GDNFYFTGVQDINDK	4 P13686	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5									SB							SB
LGDNFYFTGVQDINDK	6 P13686	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5									SB							SB
DHNLQYLQDENGVG	1 P13686	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5									SB							
GDNFYFTGVQDINDK	4 P13686	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5									SB							SB
LGDNFYFTGVQDINDK	6 P13686	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5									SB							SB
DNFYFTGVQDINDK	2 P13686	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5									SB							
VPDDIQPTISLPGVAR	2 P13716	Delta-aminolevulinic acid dehydratase									SB	SB						
DVPDDIQPTISLPGVAR	2 P13716	Delta-aminolevulinic acid dehydratase									SB	SB						
VPDDIQPTISLPGVAR	2 P13716	Delta-aminolevulinic acid dehydratase									W B	W B						
DVPDDIQPTISLPGVAR	2 P13716	Delta-aminolevulinic acid dehydratase									W B	W B						
AAQISEQKSNDASEA	2 P13747	HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain E									SB							

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad																
			MCF-7																
				1	2	3	7	12	14	21	22								
PSM			Péptid PSM	DR*03:01	DR*13:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01	
AAQISEQKSSNDASE	1 P13747	HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain E						SB											
SRQDLFAVDITQVGTVT	2 P13798	Acylamino-acid-releasing enzyme	2	4				SB											
QDSILSLPGNVGHQD	1 P13798	Acylamino-acid-releasing enzyme	2	4				SB											
NYNQYDLNRNFPDAFE	4 P14384	Carboxypeptidase M											SB						
NYNQYDLNRNFPDA	2 P14384	Carboxypeptidase M											W	B					
YNQYDLNRNFPDAFE	1 P14384	Carboxypeptidase M											SB						
KQDATSTIISITNNVIG	7 P15144	Aminopeptidase N				W	W	W	W	W								W	B
DHSAIPVINRAQIINDA	2 P15144	Aminopeptidase N				B	B	B	B	B								W	B
SAIPVINRAQIINDA	4 P15144	Aminopeptidase N						W	W					W				W	B
SAIPVINRAQIIND	6 P15144	Aminopeptidase N						W	W									W	B
SAIPVINRAQIIN	5 P15144	Aminopeptidase N						W	W									W	B
KQDATSTIISITNNVIG	7 P15144	Aminopeptidase N				W	W	W	W	W								W	B
KQDATSTIISITNNVIG	7 P15144	Aminopeptidase N				B	B	B	B	B								W	B
KQDATSTIISITNNVIGQG	7 P15144	Aminopeptidase N						W	W	W			W	W					
KQDATSTIISITNNVIGQ	3 P15144	Aminopeptidase N						W	W	W									
TPAQISELFDAISYSK	4 P15144	Aminopeptidase N						SB											
KQDATSTIISITNNVIGQGL	1 P15144	Aminopeptidase N						W	W										
KQDATSTIISITNNVIG	7 P15144	Aminopeptidase N						W	W	W	W							W	B
KQDATSTIISITNNVIGQG	7 P15144	Aminopeptidase N						W	W	W	W			W	W				
KQDATSTIISITNNVIGQ	3 P15144	Aminopeptidase N						W	W	W				B	B				
KQDATSTIISITNNVIGQGL	1 P15144	Aminopeptidase N						W	W										
SAIPVINRAQIIN	5 P15144	Aminopeptidase N						W	W									W	B
SAIPVINRAQIINDA	4 P15144	Aminopeptidase N						W	W					W				W	B
SAIPVINRAQIIND	6 P15144	Aminopeptidase N						W	W									W	B
KQDATSTIISITNNVIG	7 P15144	Aminopeptidase N						W	W	W	W							W	B
KQDATSTIISITNNVIGQG	7 P15144	Aminopeptidase N						W	W	W	W			W	W				
KQDATSTIISITNNVIGQ	3 P15144	Aminopeptidase N						W	W	W				B	B				
INDAFNLASAHKVPVT	2 P15144	Aminopeptidase N								SB	SB								
FDAISYSKGSV	2 P15144	Aminopeptidase N								W	B								
KQDATSTIISITNNVIG	7 P15144	Aminopeptidase N						W	W	W	W							W	B

Secuencia	Identificador	Descripción	PSM	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad										
				MCF-7										
				1	2	3	7	12	14	21	22			
KQDATSTIISITNNVIGQG	7 P15144	Aminopeptidase N				W B	W B	W B	W B					
KQDATSTIISITNNVIGQ	3 P15144	Aminopeptidase N				W B	W B	W B	W B					
SAIPVINRAQIIN	5 P15144	Aminopeptidase N					W B	W B					W B	
SAIPVINRAQIINDA	4 P15144	Aminopeptidase N					W B	W B			W B		W B	
SAIPVINRAQIIND	6 P15144	Aminopeptidase N					W B	W B					W B	
INDAFNLASAHKVPVT	2 P15144	Aminopeptidase N						SB	SB					
KQDATSTIISITNNVIGQG	7 P15144	Aminopeptidase N				W B	W B	W B	W B		W B	W B		
KQDATSTIISITNNVIGQG	7 P15144	Aminopeptidase N				W B	W B	W B	W B		W B	W B		
SAIPVINRAQIINDA	4 P15144	Aminopeptidase N					W B	W B			W B		W B	
VPVFTVEVKNYG	2 P15260	Interferon gamma receptor 1									W B			
MPQVPVFTVEVKNYG	2 P15260	Interferon gamma receptor 1									W B			
IMPQVPVFTVEVKNYG	1 P15260	Interferon gamma receptor 1									W B			
SRLPQLVGVSTPLQGGG	2 P15291	Beta-1,4-galactosyltransferase 1						SB						
SRLPQLVGVSTPLQGGSN	2 P15291	Beta-1,4-galactosyltransferase 1						SB						
DLSRLPQLVGVSTPLQGGG	1 P15291	Beta-1,4-galactosyltransferase 1						SB						
RLPQLVGVSTPLQGGSN	2 P15291	Beta-1,4-galactosyltransferase 1						SB						
DLSRLPQLVGVSTPLQGGG N	2 P15291	Beta-1,4-galactosyltransferase 1						SB						
RLPQLVGVSTPLQGGG	2 P15291	Beta-1,4-galactosyltransferase 1						SB						
IPGYVDDSVRVEQ	7 P15514	Amphiregulin				SB				SB	SB		SB	
IPGYVDDSVRVEQ	7 P15514	Amphiregulin				SB				SB	SB		SB	
IPGYVDDSVRVE	2 P15514	Amphiregulin				SB								
EPQIPGYVDDSVRVEQ	4 P15514	Amphiregulin				W B				W B	W B			
PGYVDDSVRVEQ	1 P15514	Amphiregulin				SB								
EPQIPGYVDDSVRV	2 P15514	Amphiregulin				W B								
IPGYVDDSVRVEQ	7 P15514	Amphiregulin				SB				SB	SB		SB	
EPQIPGYVDDSVRVEQ	4 P15514	Amphiregulin				W B				W B	W B			
IPGYVDDSVRVEQ	7 P15514	Amphiregulin				SB				SB	SB		SB	
EPQIPGYVDDSVRVEQ	4 P15514	Amphiregulin				W B				W B	W B			
GPEKDIEFIYTAPSSA	4 P16035	Metalloproteinase inhibitor 2											SB	
GPEKDIEFIYTAPSSAV	3 P16035	Metalloproteinase inhibitor 2											SB	
GPEKDIEFIYTAPSS	2 P16035	Metalloproteinase inhibitor 2											SB	

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad														
			MCF-7														
				1	2	3	7	12	14	21	22						
PSM	Peptid PSM	DR*0301	DR*1301	DR*1305	DR*1501	DR*0404	DR*1302	DR*0701	DR*1302	DR*0301	DR*1303	DR*0102	DR*1302	DR*1301	DR*1302	DR*0701	
GPEKDIETIYTPAS	1 P16035	Metalloproteinase inhibitor 2					SB										
FVILEFPVEEQDR	2 P16284	Platelet endothelial cell adhesion molecule					W B										
TESYFIPEVRIYDSGT	2 P16284	Platelet endothelial cell adhesion molecule											SB				
ESYFIPEVRIYDSGTY	1 P16284	Platelet endothelial cell adhesion molecule											SB				
ESYFIPEVRIYDSGT	1 P16284	Platelet endothelial cell adhesion molecule											SB				
ESYFIPEVRIYDS	1 P16284	Platelet endothelial cell adhesion molecule											SB				
ESYFIPEVRIYDSG	1 P16284	Platelet endothelial cell adhesion molecule											SB				
STESYFIPEVRIYDSGTY	2 P16284	Platelet endothelial cell adhesion molecule											SB				
SYFIPEVRIYDSGTY	1 P16284	Platelet endothelial cell adhesion molecule											SB				
NSTEFDPITSHPVVVD	2 P17812	CTP synthase 1	1	1					SB	SB							
DANSTEFDPITSHPV	2 P17812	CTP synthase 1	1	1					SB								
NSTEFDPITSHPVVVD	2 P17812	CTP synthase 1	1	1					W B	W B							
GPPYVSWLIDANHNMQ	5 P17813	Endoglin			W B								W B				
GPPYVSWLIDANHNMQ	5 P17813	Endoglin			W B								W B				
EVIDAITTTAQSHQ	1 P17858	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type	2	2				SB									
MEVIDAITTTAQSHQ	1 P17858	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type	2	2				SB									
TGETIRSQNVMAAAS	1 P17987	T-complex protein 1 subunit alpha	6	16				SB	SB								
TGETIRSQNVMAAAS	1 P17987	T-complex protein 1 subunit alpha	6	16				W B	W B								
ISPMVMDAKAVAGNI	2 P18206	Vinculin	6	10	SB	SB							SB	SB			
TISPMVMDAKAVAGNISDPG	2 P18206	Vinculin	6	10	SB												
ISPMVMDAKAVAGNIS	2 P18206	Vinculin	6	10	SB												
TISPMVMDAKAVAGNIS	2 P18206	Vinculin	6	10	SB												
ISPMVMDAKAVAGNISDPG	1 P18206	Vinculin	6	10	SB												
TISPMVMDAKAVAGNI	1 P18206	Vinculin	6	10	SB												
ISPMVMDAKAVAGNI	1 P18206	Vinculin	6	10	SB	SB							SB	SB			
ISPMVMDAKAVAGNI	2 P18206	Vinculin	6	10	W B	W B							W B	W B			
ISPMVMDAKAVAGNI	1 P18206	Vinculin	6	10	W B	W B							W B	W B			
ISPMVMDAKAVAGNI	2 P18206	Vinculin	6	10	SB	SB							SB	SB			
ISPMVMDAKAVAGNI	2 P18206	Vinculin	6	10	SB	SB							SB	SB			

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad											
			PSM	MCF-7										
				1	2	3	7	12	14	21	22			
Peptid PSM	DR*03:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01
GSSPVAMQKAQQVSQG	1 P18206	Vinculin	6 10										SB SB	
GSSPVAMQKAQQVSQG	1 P18206	Vinculin	6 10										SB SB	
IPVDEEAFVIDFKPRASMD	1 P19021	Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase											SB SB	
IPVDEEAFVIDFKPRASMD	1 P19021	Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase											SB SB	
EPKEDLPVITIDPASPQSE	6 P19634	Sodium/hydrogen exchanger 1		SB			SB SB			SB SB				
EPKEDLPVITIDPASPQSE	6 P19634	Sodium/hydrogen exchanger 1		W B		W B	W B		W B	W B				
EPKEDLPVITIDPASPQSE	6 P19634	Sodium/hydrogen exchanger 1		W B		W B	W B		W B	W B				
EPKEDLPVITIDPASPQSE	6 P19634	Sodium/hydrogen exchanger 1		SB			SB SB			SB SB				
EPKEDLPVITIDPASPQSE	6 P19634	Sodium/hydrogen exchanger 1		W B		W B	W B		W B	W B				
LRAIFILNEANNLGLL	2 P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2												SB
RAIFILNEANNLGLL	6 P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2					SB SB	SB SB						SB
LRAIFILNEANNLG	8 P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2					SB SB	SB SB						SB
SPQPQNVVFDVQIPKG	2 P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2		SB										
LRAIFILNEANNLG	8 P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2					W B	W B	W B	W B				W B
DPAKLDQIESVITATSANT Q	2 P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2					W B							
KLDQIESVITATSANT	2 P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2					SB							
DPAKLDQIESVITATSANT	4 P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2					W B							
KLDQIESVITATSAN	2 P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2					SB							
RAIFILNEANNLGLLDPN	2 P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2					W B	W B						
RAIFILNEANNLGLLDPNS	2 P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2					W B							
RAIFILNEANNLGLL	6 P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2					SB SB	SB SB						SB
FDPKLDQIESVITATSANT	2 P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2					W B							
DPAKLDQIESVITATSA	1 P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2					W B							
LRAIFILNEANNLG	8 P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2					SB SB	SB SB						SB

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	PSM	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad														
					1	2	3	7	12	14	21	22							
				Péptid PSM	DR*0301	DR*1301	DR*1305	DR*1501	DR*0404	DR*1302	DR*07501	DR*1302	DR*0301	DR*1303	DR*0102	DR*1302	DR*1301	DR*1302	DR*07501
RAIFILNEANNLGLLDPN	2 P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2							W B	W B									
RAIFILNEANNLGLL	6 P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2							SB	SB	SB	SB							SB
LRAIFILNEANNLG	8 P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2							W B	W B	W B	W B							W B
RAIFILNEANNLGLL	6 P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2							W B	W B	W B	W B							W B
LRAIFILNEANNLG	8 P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2							SB	SB	SB	SB							SB
RAIFILNEANNLGLL	6 P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2							SB	SB	SB	SB							SB
AIFILNEANNLGLL	2 P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2											W B						
TEVNVLPGAKVQFE	2 P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2													SB				
DFVRGFSLDEATNLNGGL	4 P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1			W B								W B						
DFVRGFSLDEATNLNG	3 P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1			W B								W B						
VRGFSLDEATNLNG	2 P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1			W B								W B						
LPELSNHASILIM	1 P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1									W B								
DFVRGFSLDEATNLNGGL	4 P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1			W B								W B						
DFVRGFSLDEATNLNG	3 P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1			W B								W B						
VRGFSLDEATNLNG	2 P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1			W B								W B						
YEGSEIVVAGRIADN	2 P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1											W B	W B					
FVRGFSLDEATNLNG	3 P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1											W B						
DFVRGFSLDEATNLNGG	1 P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1											W B						
EGSEIVVAGRIADNKQ	2 P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1											W B	W B					
YEGSEIVVAGRIADNKQ	4 P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1											W B	W B					
EGSEIVVAGRIADN	2 P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1											W B	W B					
IPKTAFISDFAVTADG	3 P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1											W B						
YEGSEIVVAGRIADN	2 P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1											SB	SB					
EGSEIVVAGRIADNKQ	2 P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1											SB	SB					

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad											
			PSM	MCF-7										
				1	2	3	7	12	14	21	22			
YEGSEIVVAGRIADNKQ	4 P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1								SB	SB			
EGSEIVVAGRIADN	2 P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1								SB	SB			
APADGTVELVRALPL	1 P19971	Thymidine phosphorylase						W	B					
DPPEVTVPKPEVEL	4 P20036	HLA class II histocompatibility antigen, DP alpha 1 chain		SB								SB	SB	
DPPEVTVPKPEVE	4 P20036	HLA class II histocompatibility antigen, DP alpha 1 chain		SB								SB	SB	
DPPEVTVPKPEVEL	4 P20036	HLA class II histocompatibility antigen, DP alpha 1 chain		SB								SB	SB	
DPPEVTVPKPEVE	4 P20036	HLA class II histocompatibility antigen, DP alpha 1 chain		SB								SB	SB	
DPPEVTVPKPEVE	4 P20036	HLA class II histocompatibility antigen, DP alpha 1 chain		SB								SB	SB	
DPPEVTVPKPEVE	4 P20036	HLA class II histocompatibility antigen, DP alpha 1 chain		SB								SB	SB	
DPPEVTVPKPEVEL	4 P20036	HLA class II histocompatibility antigen, DP alpha 1 chain		SB								SB	SB	
DPPEVTVPKPEVELG	1 P20036	HLA class II histocompatibility antigen, DP alpha 1 chain		SB										
NDPPEVTVPKPEVELG	1 P20036	HLA class II histocompatibility antigen, DP alpha 1 chain		SB										
ATNDPPEVTVPKPEVE	1 P20036	HLA class II histocompatibility antigen, DP alpha 1 chain		SB										
GLANIAILNNNLNTL	1 P20036	HLA class II histocompatibility antigen, DP alpha 1 chain				SB								
SPNIVIALSGNKADL	1 P20339	Ras-related protein Rab-5A	3	10								SB		
DYKDVIPMADAAGIIR	2 P20702	Integrin alpha-X				SB								
REQVSEQTLVQSN	2 P20702	Integrin alpha-X				SB								
DYKDVIPMADAAGII	1 P20702	Integrin alpha-X				SB								
DVIPMADAAGIIR	1 P20702	Integrin alpha-X				SB								
YTVAYVPDVTGRYT	3 P21333	Filamin-A	5	18					W	W			W	
			5	9					B	B			B	
IGEETVTVDTKAAGKGK	5 P21333	Filamin-A	5	18	SB	SB								
			5	9										

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	PSM	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad															
					1		2		3		7		12		14		21		22	
					Péptid	PSM	Péptid	PSM	Péptid	PSM	Péptid	PSM	Péptid	PSM	Péptid	PSM	Péptid	PSM	Péptid	PSM
IGEEITVITVDTKAAGKG	8 P21333	Filamin-A		5 18 SB SB																
EETVITVDTKAAGKG	3 P21333	Filamin-A		5 18 SB SB																
GEETVITVDTKAAGKG	4 P21333	Filamin-A		5 18 SB SB																
EETVITVDTKAAGKGK	1 P21333	Filamin-A		5 18 SB SB																
IGEEITVITVDTKAAGKGK	5 P21333	Filamin-A		5 18 SB SB																
IGEEITVITVDTKAAGKG	8 P21333	Filamin-A		5 18 SB SB																
EETVITVDTKAAGKG	3 P21333	Filamin-A		5 18 SB SB																
GEETVITVDTKAAGKG	4 P21333	Filamin-A		5 18 SB SB																
EETVITVDTKAAGKGK	1 P21333	Filamin-A		5 18 SB SB																
GEVLVYVEDPAGHQE	1 P21333	Filamin-A		5 18																
GEVLVYVEDPAGHQ	1 P21333	Filamin-A		5 18																
IGEEITVITVDTKAAGKG	8 P21333	Filamin-A		5 18 SB SB																
EETVITVDTKAAGKG	3 P21333	Filamin-A		5 18 SB SB																
GEETVITVDTKAAGKG	4 P21333	Filamin-A		5 18 SB SB																
YTVAYVPDVTGRYT	3 P21333	Filamin-A		5 18																
ETVITVDTKAAGKG	2 P21333	Filamin-A		5 18																
IGEEITVITVDTKAAGKG	8 P21333	Filamin-A		5 18 SB SB																
EETVITVDTKAAGKG	3 P21333	Filamin-A		5 18 SB SB																
GEETVITVDTKAAGKG	4 P21333	Filamin-A		5 18 SB SB																
YTVAYVPDVTGRYT	3 P21333	Filamin-A		5 18																
ETVITVDTKAAGKG	2 P21333	Filamin-A		5 18																
IGEEITVITVDTKAAGKG	8 P21333	Filamin-A		5 18 SB SB																
EETVITVDTKAAGKG	3 P21333	Filamin-A		5 18 SB SB																
GEETVITVDTKAAGKG	4 P21333	Filamin-A		5 18 SB SB																
APGSYLISIKYGGPY	2 P21333	Filamin-A		5 18																
EPGNYIINIKFADQ	2 P21333	Filamin-A		5 18																
YTVAYVPDVTGRYT	3 P21333	Filamin-A		5 18																
ETVITVDTKAAGKG	2 P21333	Filamin-A		5 18																
MDFIVAASNLRAEN	1 P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1		1 45																
MDFIVAASNLRAEN	1 P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1		1 45																
GGNLVSIQNEKEQ	2 P22897	Macrophage mannose receptor 1																		
FGGNLVSQNEKEQA	2 P22897	Macrophage mannose receptor 1																		
GNLVSQNEKEQ	2 P22897	Macrophage mannose receptor 1																		
LHNSLIASILDPSYNAF	2 P22897	Macrophage mannose receptor 1																		
LHNSLIASILDPSYNS	2 P22897	Macrophage mannose receptor 1																		

Secuencia	Identificador	Descripción	PSM	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad													
				MCF-7													
					1	2	3	7	12	14	21	22					
Peptid PSM	DR*03:01	DR*13:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01		
HNSLIASILDYPYSN	4 P22897	Macrophage mannose receptor 1													SB		
NSLIASILDYPYSNAF	2 P22897	Macrophage mannose receptor 1													SB		
HNSLIASILDYPYSNAF	2 P22897	Macrophage mannose receptor 1													SB		
HNSLIASILDYPYSNA	2 P22897	Macrophage mannose receptor 1													SB		
FGGNLVSIQNEKEQ	2 P22897	Macrophage mannose receptor 1													SB		
GGNLVSIQNEKEQA	2 P22897	Macrophage mannose receptor 1													SB		
GNLVSIQNEKEQA	1 P22897	Macrophage mannose receptor 1													SB		
VAALRWVQDNIAFG	1 P23141	Liver carboxylesterase 1													SB		
EGKEILVGDVGGQTVDDPY A	1 P23528	Cofilin-1		1 49 0											W B		
TTAFQYIIDNKGIDSDA	2 P25774	Cathepsin S													SB SB		
TTAFQYIIDNKGIDSD	5 P25774	Cathepsin S													SB SB		
TTAFQYIIDNKGID	3 P25774	Cathepsin S													SB		
TAFQYIIDNKGIDS	2 P25774	Cathepsin S													SB SB		
TAFQYIIDNKGIDSDA	3 P25774	Cathepsin S													SB SB	SB SB	
TTAFQYIIDNKGIDS	3 P25774	Cathepsin S													SB SB		
TAFQYIIDNKGID	2 P25774	Cathepsin S													SB		
TAFQYIIDNKGIDSD	3 P25774	Cathepsin S													SB SB	SB SB	
GVLVVGYGDLNGKEY	1 P25774	Cathepsin S													W B		
TTAFQYIIDNKGIDSDA	2 P25774	Cathepsin S													SB SB		
TTAFQYIIDNKGIDSD	5 P25774	Cathepsin S													SB SB		
TAFQYIIDNKGIDS	2 P25774	Cathepsin S													W B B	W B	
TAFQYIIDNKGIDSDA	3 P25774	Cathepsin S													SB SB	SB SB	
TTAFQYIIDNKGIDS	3 P25774	Cathepsin S													W B B	W B	
TAFQYIIDNKGIDSD	3 P25774	Cathepsin S													SB SB	SB SB	
TAFQYIIDNKGIDSDA	3 P25774	Cathepsin S													W B B	W B B	
TAFQYIIDNKGIDSD	3 P25774	Cathepsin S													W B B	W B B	
FQYIIDNKGIDSDASYPY	2 P25774	Cathepsin S														W B B	W B B
FQYIIDNKGIDSDAS	4 P25774	Cathepsin S														W B B	W B B
QYIIDNKGIDSDASYPY	2 P25774	Cathepsin S														W B B	W B B
TAFQYIIDNKGIDSDAS	3 P25774	Cathepsin S														W B B	W B B
TTAFQYIIDNKGIDSDAS	2 P25774	Cathepsin S														W B B	W B B

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	PSM	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad														
					Péptid PSM														
						1	2	3	7	12	14	21	22						
FQYIIDNKGIDS	2 P25774	Cathepsin S			DR*03:01	DR*13:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01
FQYIIDNKGIDSDA	2 P25774	Cathepsin S								W	W	B	B						
FQYIIDNKGIDS	2 P25774	Cathepsin S								W	W	B	B						
AFQYIIDNKGIDSASYPY	2 P25774	Cathepsin S								W	W	B	B						
AFQYIIDNKGIDSDAS	2 P25774	Cathepsin S								W	W	B	B						
QYIIDNKGIDSASYP	1 P25774	Cathepsin S								W	W	B	B						
QYIIDNKGIDSDAS	2 P25774	Cathepsin S								W	W	B	B						
AFQYIIDNKGIDSDA	2 P25774	Cathepsin S								SB	SB								
FQYIIDNKGIDSASYP	2 P25774	Cathepsin S								W	W	B	B						
QYIIDNKGIDSDA	2 P25774	Cathepsin S								W	W	B	B						
TTAFQYIIDNKGIDSASYP Y	1 P25774	Cathepsin S								W	W	B	B						
YIIDNKGIDSASYPY	1 P25774	Cathepsin S								W	B								
YIIDNKGIDSASYPYK	1 P25774	Cathepsin S								SB									
TAFQYIIDNKGIDSASYPY	2 P25774	Cathepsin S								W	W	B	B						
TAFQYIIDNKGIDSASYP	1 P25774	Cathepsin S								W	W	B	B						
AFQYIIDNKGIDS	1 P25774	Cathepsin S								W	W	B	B						
AFQYIIDNKGIDS	1 P25774	Cathepsin S								W	W	B	B						
TAFQYIIDNKGIDSDA	3 P25774	Cathepsin S						SB	SB			SB	SB						
TAFQYIIDNKGIDS	3 P25774	Cathepsin S						SB	SB			SB	SB						
FQYIIDNKGIDSASYPY	2 P25774	Cathepsin S										SB	SB						
FQYIIDNKGIDSDAS	4 P25774	Cathepsin S										SB	SB						
QYIIDNKGIDSASYPY	2 P25774	Cathepsin S										SB	SB						
TAFQYIIDNKGIDSDAS	3 P25774	Cathepsin S										SB	SB						
TTAFQYIIDNKGIDSDAS	2 P25774	Cathepsin S										SB	SB						
FQYIIDNKGIDS	2 P25774	Cathepsin S										SB	SB						
FQYIIDNKGIDSDA	2 P25774	Cathepsin S										SB	SB						
FQYIIDNKGIDS	2 P25774	Cathepsin S										SB	SB						
AFQYIIDNKGIDSASYPY	2 P25774	Cathepsin S										SB	SB						
AFQYIIDNKGIDSDAS	2 P25774	Cathepsin S										SB	SB						
QYIIDNKGIDSASYP	1 P25774	Cathepsin S										SB	SB						
QYIIDNKGIDSDAS	2 P25774	Cathepsin S										SB	SB						

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19), alelo y predicción de afinidad													
			PSM	MCF-7												
					1	2	3	7	12	14	21	22				
Peptid PSM	DR*03:01	DR*13:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01	
AFQYIIDNKGIDSDA	2 P25774	Cathepsin S											SB	SB		
FQYIIDNKGIDSDASYP	2 P25774	Cathepsin S											SB	SB		
QYIIDNKGIDSDA	2 P25774	Cathepsin S											SB	SB		
TTAFQYIIDNKGIDSDASYP Y	1 P25774	Cathepsin S											SB	SB		
TAFQYIIDNKGIDSDASYPY	2 P25774	Cathepsin S											SB	SB		
TAFQYIIDNKGIDSDASYP	1 P25774	Cathepsin S											SB	SB		
AFQYIIDNKGIDSD	1 P25774	Cathepsin S											SB	SB		
AFQYIIDNKGIDS	1 P25774	Cathepsin S											SB	SB		
TGKLVLSAQNLVD	1 P25774	Cathepsin S													SB	SB
TGKLVLSAQNLVD	1 P25774	Cathepsin S													W B	W B
AELFAIQPNITGKQ	2 P26038	Moesin						SB								
LEFAIQPNITGKQ	1 P26038	Moesin						SB								
DAELEFAIQPNITGKQL	1 P26038	Moesin						SB								
AELEFAIQPNITGKQL	1 P26038	Moesin						SB								
RGLLQQIGDALSSQ	4 P26572	Alpha-1,3-mannosyl- glycoprotein 2-beta-N- acetylglucosaminyltrans- ferase						SB								
NGINISPDGKYVYIAE	4 P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1						SB	SB				SB	SB		
NGINISPDGKYVYIAEL	4 P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1						SB	SB				SB	SB		
GINISPDGKYVYIAEL	3 P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1						SB	SB				SB	SB		
FANGINISPDGKYVYIAE	2 P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1						SB	SB							
NGINISPDGKYVYIAE	4 P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1						W B	W B				W B	W B		
NGINISPDGKYVYIAEL	4 P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1						W B	W B				W B	W B		
GINISPDGKYVYIAEL	3 P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1						W B	W B				W B	W B		
FANGINISPDGKYVYIAE	2 P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1						W B	W B							
NGINISPDGKYVYIAE	4 P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1						SB	SB				SB	SB		
NGINISPDGKYVYIAEL	4 P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1						SB	SB				SB	SB		
GINISPDGKYVYIAEL	3 P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1						SB	SB				SB	SB		

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad																
			MCF-7																
				1	2	3	7	12	14	21	22								
PSM			Péptid PSM	DR*03:01	DR*13:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01	
NGINISPDGKYVYIAE	4 P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1	W B	W B							W B	W B							
NGINISPDGKYVYIAEL	4 P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1	W B	W B							W B	W B							
GINISPDGKYVYIAEL	3 P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1	W B	W B							W B	W B							
LNDDISLYKSFLQLG	2 P27449	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit				SB													
DDISLYKSFLQLGAG	1 P27449	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit				SB													
NDDISLYKSFLQLG	1 P27449	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit				SB													
DDISLYKSFLQLG	1 P27449	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit				SB													
NDDISLYKSFLQLGAG	1 P27449	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit				SB													
GTGIAAMSVMRPEQ	1 P27449	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit								W B									
GGGYVKLFPNSLDQTD	2 P27797	Calreticulin	6	29		SB													
GGYVKLFPNSLDQ	2 P27797	Calreticulin	6	29						W B									
GGGYVKLFPNSLDQT	2 P27797	Calreticulin	6	29		SB													
GGGYVKLFPNSLDQ	1 P27797	Calreticulin	6	29						W B									
GPQLFHMDPSGTFVQ	3 P28066	Proteasome subunit alpha type-5	5	12	W B						W B	W B						W B	
GPQLFHMDPSGTFVQ	3 P28066	Proteasome subunit alpha type-5	5	12	W B						W B	W B						W B	
GPQLFHMDPSGTFVQ	3 P28066	Proteasome subunit alpha type-5	5	12	W B						W B	W B						W B	
GPQLFHMDPSGTFVQ	1 P28066	Proteasome subunit alpha type-5	5	12	W B						W B	W B						W B	
GPQLFHMDPSGTFVQ	3 P28066	Proteasome subunit alpha type-5	5	12	W B						W B	W B						W B	
GPQLFHMDPSGTFVQ	1 P28066	Proteasome subunit alpha type-5	5	12	W B						W B	W B						W B	
FGVLNSLANVLSQH	4 P28068	HLA class II histocompatibility antigen, DM beta chain				SB													
AQIEVVPSASALIHK	1 P30050	60S ribosomal protein L12	3	5							SB	SB							
AQIEVVPSASALIHK	1 P30050	60S ribosomal protein L12	3	5							W B	W B							

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad														
			MCF-7														
				1	2	3	7	12	14	21	22						
	PSM		Péptid	DR*03:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01
VKSEIIPMFNSLASDEQ	2 P30153	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	5 10				SB SB										
VKSEIIPMFNSLASDEQ	2 P30153	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	5 10				SB SB										
VKSEIIPMFNSLASDE	2 P30153	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	5 10				SB SB										
KSEIIPMFNSLASDE	2 P30153	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	5 10				SB SB										
VKSEIIPMFNSLASDEQ	2 P30153	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	5 10					W B									
VKSEIIPMFNSLASDEQ	2 P30153	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	5 10					W B									
VKSEIIPMFNSLASDE	2 P30153	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	5 10					W B									
KSEIIPMFNSLASDE	2 P30153	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	5 10					W B									
DPEVQQIMSDPAMRL	4 P31948	Stress-induced-phosphoprotein 1	1 46 9	W B							W B						
DPEVQQIMSDPAMRLILE	2 P31948	Stress-induced-phosphoprotein 1	1 46 9	W B							W B						
DPEVQQIMSDPAMRL	4 P31948	Stress-induced-phosphoprotein 1	1 46 9	W B							W B						
DPEVQQIMSDPAMRLILE	2 P31948	Stress-induced-phosphoprotein 1	1 46 9	W B							W B						
DPEVQQIMSDPAMRL	1 P31948	Stress-induced-phosphoprotein 1	1 46 9	W B							W B						
MNTELAAFSTKNQKDPGVL	1 P31949	Protein S100-A11	2 14				SB										
LDGIYVSEKGTVQQADE	2 P32969	60S ribosomal protein L9								W B							
EGEIHGDGINIAK	1 P33527	Multidrug resistance-associated protein 1					SB SB										
EGEIHGDGINIAK	1 P33527	Multidrug resistance-associated protein 1					SB SB										
AIFFLPDSSKLLSG	3 P33908	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA		W B												W B	
GAIIFFLPDSSKLLSG	5 P33908	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA		W B							W B						

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad														
				1	2	3	7	12	14	21	22							
	PSM		Péptid PSM	DR*03/01	DR*13/01	DR*13/05	DR*15/01	DR*04/04	DR*13/02	DR*07/01	DR*13/02	DR*03/01	DR*13/03	DR*01/02	DR*13/02	DR*13/01	DR*13/02	DR*07/01
AIFFLPDSSKLLSG	3 P33908	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA		W B														W B
GAIFFLPDSSKLLSG	5 P33908	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA		W B								W B						
IDQINTDLNLSHAQ	2 P35579	Myosin-9	2 48 SB 1															
EEKPIFSLNTVASADS	1 P36542	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial							SB SB									
EEKPIFSLNTVASADS	1 P36542	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial						W B	W B									
IEEYLDKPTQPILE	6 P38484	Interferon gamma receptor 2		W B								W B	W B					W B
IEEYLDKPTQPILE	6 P38484	Interferon gamma receptor 2		W B								W B	W B					W B
IEEYLDKPTQPIL	2 P38484	Interferon gamma receptor 2		W B														
EEYLDKPTQPILE	1 P38484	Interferon gamma receptor 2		W B														
IEEYLDKPTQPILE	6 P38484	Interferon gamma receptor 2		W B								W B	W B					W B
IEEYLDKPTQPILE	6 P38484	Interferon gamma receptor 2		W B								W B	W B					W B
INNYTPDMNREDVDYA	2 P39900	Macrophage metalloelastase												SB				
KNITYEIQDNTGSM	2 P41218	Myeloid cell nuclear differentiation antigen								SB								
KNITYEIQDNTGSM	2 P41218	Myeloid cell nuclear differentiation antigen								SB								
KNITYEIQDNTGSM	2 P41218	Myeloid cell nuclear differentiation antigen								SB								
IAAKYQLDPTASISAK	2 P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2		SB											SB SB			
AAKYQLDPTASISA	1 P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2		W B														
IAAKYQLDPTASISAK	2 P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2		SB											SB SB			
IAAKYQLDPTASISA	2 P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2										W B	W B					
IAAKYQLDPTASISAK	2 P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2		SB											SB SB			
IAAKYQLDPTASISA	2 P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2													SB SB			
EEVTLIRSNQQL	2 P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	1 24 1															SB SB
EEVTLIRSNQQL	2 P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	1 24 1									W B	W B					

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad														
			PSM	MCF-7													
					1	2	3	7	12	14	21	22					
			Pepid PSM	DR*03:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:02	DR*13:01	DR*07:01	
LPPQQIEKNLSDLIDL	1 P47756	F-actin-capping protein subunit beta	5	17												W B	
ILRVINEPTAAAMAY	2 P48723	Heat shock 70 kDa protein 13								SB							
NNPAIVIGNNGQIH	2 P49257	Protein ERGIC-53								SB	SB						
NPAIVIGNNGQIH	2 P49257	Protein ERGIC-53								SB	SB						
NNPAIVIGNNGQIH	2 P49257	Protein ERGIC-53								SB	SB						
NPAIVIGNNGQIH	2 P49257	Protein ERGIC-53								SB	SB						
SPSAIYNIDTSSEPDH	2 P49327	Fatty acid synthase	4	14						W B							
GGIVMINDGNAILR	3 P49368	T-complex protein 1 subunit gamma	8	16						SB	SB	SB					
GGIVMINDGNAILR	3 P49368	T-complex protein 1 subunit gamma	8	16						W B	W B	W B					
GGIVMINDGNAILR	3 P49368	T-complex protein 1 subunit gamma	8	16						W B	W B	W B					
EGFHGDSTPFDGEGG	1 P50281	Matrix metalloproteinase-14														W B	
AEGFHGDSTPFDGEGG	1 P50281	Matrix metalloproteinase-14														SB	
GSQITQQSTNQRSNPA	1 P50750	Cyclin-dependent kinase 9	2	4						SB							
ASPNIVIALAGNKADL	2 P51148	Ras-related protein Rab-5C	5	14						W B							
ASPNIVIALAGNKADLA	3 P51148	Ras-related protein Rab-5C	5	14						W B						W B	
ASPNIVIALAGNKADLA	3 P51148	Ras-related protein Rab-5C	5	14						SB						SB	
ASPNIVIALAGNKADLAS	1 P51148	Ras-related protein Rab-5C	5	14												SB	
SPNIVIALAGNKADL	1 P51148	Ras-related protein Rab-5C	5	14												SB	
EAINVEQAFQITAR	1 P51149	Ras-related protein Rab-7a	5	12												SB	
EFIYYADVKEPES	1 P51151	Ras-related protein Rab-9A														W B B	
EFIYYADVKEPES	1 P51151	Ras-related protein Rab-9A														SB SB	
LDLSFNQIARLPSG	1 P51884	Lumican								SB							
DGPVVTDPKAPNVV	1 P52566	Rho GDP-dissociation inhibitor 2								SB							
NVDSYTESVKEYDSIS	1 P54920	Alpha-soluble NSF attachment protein	1	1												SB	
DGIDSIVVDNVPQVGPDR	3 P55884	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	6	9	SB											SB SB	
DGIDSIVVDNVPQVGPDR	3 P55884	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	6	9	SB											SB SB	
DGIDSIVVDNVPQVGPDR	3 P55884	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	6	9	W B											W B B	
FDLYFVLDKSGSVANN	1 P58335	Anthrax toxin receptor 2														SB	

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19)-, alelo y predicción de afinidad												
			PSM	MCF-7											
					1	2	3	7	12	14	21	22			
Péptid PSM	DR*03/01	DR*13/01	DR*13/05	DR*15/01	DR*04/04	DR*13/02	DR*07/01	DR*13/02	DR*03/01	DR*13/03	DR*01/02	DR*13/02	DR*13/01	DR*13/02	DR*07/01
AFDLYFVLDKSGSVAN	1 P58335	Anthrax toxin receptor 2													W B
FDLYFVLDKSGSVAN	3 P58335	Anthrax toxin receptor 2								SB SB					SB
DLYFVLDKSGSVAN	2 P58335	Anthrax toxin receptor 2													SB
FDLYFVLDKSGSVAN	3 P58335	Anthrax toxin receptor 2									W B	W B			W B
FDLYFVLDKSGSVAN	3 P58335	Anthrax toxin receptor 2									W B	W B			W B
GPDGLTAFEATDNQAIK	2 P58546	Myotrophin	1	6											SB
GLTAFEATDNQAIK	2 P58546	Myotrophin	1	6					SB						
GPDGLTAFEATDNQAIAL	2 P58546	Myotrophin	1	6					SB						
LTAFEATDNQAIK	1 P58546	Myotrophin	1	6					SB						
EQEMATAASSSSLEK	2 P60709	Actin, cytoplasmic 1	1	25			W B								
EQEMATAASSSSLEK	1 P60709	Actin, cytoplasmic 1	1	25			W B								
NPNTVILIGNKADLE	1 P61106	Ras-related protein Rab-14	5	9								SB SB			
NPNTVILIGNKADLE	1 P61106	Ras-related protein Rab-14	5	9								W B	W B		
VADIEVDGKQVELA	1 P61586	Transforming protein RhoA	1	1	SB										
YVADIEVDGKQVELA	2 P61586	Transforming protein RhoA	1	1						SB SB					
YVADIEVDGKQVELA	2 P61586	Transforming protein RhoA	1	1						SB SB					
LLYYTEFTPTEKDE	1 P61769	Beta-2-microglobulin									W B				
FYLLYYTEFTPTEKDE	2 P61769	Beta-2-microglobulin									W B				
YLLYYTEFTPTEKDE	2 P61769	Beta-2-microglobulin									W B				
LLYYTEFTPTEKDEYA	2 P61769	Beta-2-microglobulin									W B				
GSEDRIITITGTQDQIQN	1 P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	9	33			W B								
GDSVIVVLRNPLIAG	1 P62316	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	5	14			SB SB								
GDSVIVVLRNPLIAG	1 P62316	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	5	14			SB SB								
TAQVILNHPGQISAGY	6 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48			W B	W B					W B	W B	
FTAQVILNHPGQISAG	3 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48				W B					W B	W B	
TAQVILNHPGQISAG	1 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48			W B	W B					W B	W B	
FTAQVILNHPGQIS	5 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48			W B	W B					W B	W B	
AQVILNHPGQISAG	1 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48			W B	W B			W B	W B	W B	W B	
TAQVILNHPGQIS	5 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48			W B	W B					W B	W B	
AQVILNHPGQISA	5 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48			W B	W B			W B	W B	W B	W B	

Secuencia	Identificador	Descripción	PSM	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad															
					1		2		3		7		12		14		21		22	
					Péptid	PSM	DR*E3:01	DR*E3:01	DR*E3:05	DR*E5:01	DR*04:04	DR*E3:02	DR*07:01	DR*E3:02	DR*03:01	DR*E3:03	DR*01:02	DR*E3:02	DR*E3:01	DR*E3:02
AQVILNHPGQIS	8 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					W	W						W	W			
									B	B						B	B			
AAGFTAQVILNHPGQISA	5 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB	SB							SB			
G																				
TAQVILNHPGQISAGYAP	3 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB								SB			
AAGFTAQVILNHPGQIS	5 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					W	W						W	W			
									B	B						B	B			
TAQVILNHPGQISAGY	6 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB	SB						SB	SB			
AGFTAQVILNHPGQIS	4 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48						SB							SB			
FTAQVILNHPGQISAG	3 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48						SB						SB	SB			
TAQVILNHPGQISAG	1 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB	SB						SB	SB			
2																				
FTAQVILNHPGQIS	5 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB	SB						SB	SB			
AQVILNHPGQISAG	1 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB	SB			SB	SB	SB	SB	SB			
0																				
TAQVILNHPGQIS	5 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB	SB						SB	SB			
AQVILNHPGQISA	5 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48						SB			SB	SB	SB	SB	SB			
AQVILNHPGQIS	8 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB	SB						SB	SB			
TAQVILNHPGQI	2 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48													SB			
AQVILNHPGQIS	8 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB	SB						SB	SB			
AGFTAQVILNHPGQISAG	2 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB	SB										
TAQVILNHPGQISAG	1 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB	SB						SB	SB			
2																				
TAQVILNHPGQISA	3 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB	SB										
FTAQVILNHPGQIS	5 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB	SB						SB	SB			
AAGFTAQVILNHPGQISA	5 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB	SB							SB			
G																				
GFTAQVILNHPGQIS	4 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB	SB				SB						
TAQVILNHPGQISAGYAP	3 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB								SB			
AQVILNHPGQISAG	1 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB	SB			SB	SB	SB	SB	SB			
0																				
AAGFTAQVILNHPGQIS	5 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					W	W						W	W			
									B	B						B	B			
TAQVILNHPGQIS	5 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB	SB						SB	SB			
TAQVILNHPGQISAGY	6 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB	SB						SB	SB			
GFTAQVILNHPGQISAG	3 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB	SB										
AQVILNHPGQIS	8 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB	SB						SB	SB			
AGFTAQVILNHPGQISAG	2 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB	SB										
TAQVILNHPGQISAG	1 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB	SB						SB	SB			
2																				
TAQVILNHPGQISA	3 P68104	Elongation factor 1-alpha 1	6	48					SB	SB										

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad														
				Péptid PSM	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad													
					1	2	3	7	12	14	21	22						
FTAQVILNHPGQIS	5 P68104	Elongation factor 1- alpha 1	6 48	DR*03/01	DR*13/01	DR*13/05	DR*15/01	DR*04/04	DR*13/02	DR*07/01	DR*13/02	DR*03/01	DR*13/03	DR*01/02	DR*13/02	DR*13/01	DR*13/02	DR*07/01
AAGFTAQVILNHPGQISA G	5 P68104	Elongation factor 1- alpha 1	6 48						SB	SB							SB	
GFTAQVILNHPGQIS	4 P68104	Elongation factor 1- alpha 1	6 48						SB	SB					SB			
AQVILNHPGQISAG	1 P68104 0	Elongation factor 1- alpha 1	6 48						SB	SB				SB	SB	SB	SB	
AAGFTAQVILNHPGQIS	5 P68104	Elongation factor 1- alpha 1	6 48						W B	W B							W B	
TAQVILNHPGQIS	5 P68104	Elongation factor 1- alpha 1	6 48						SB	SB							SB	SB
TAQVILNHPGQISAGY	6 P68104	Elongation factor 1- alpha 1	6 48						SB	SB							SB	SB
AGFTAQVILNHPGQIS	4 P68104	Elongation factor 1- alpha 1	6 48							SB								SB
FTAQVILNHPGQISAG	3 P68104	Elongation factor 1- alpha 1	6 48							SB							SB	SB
AQVILNHPGQISA	5 P68104	Elongation factor 1- alpha 1	6 48							SB							SB	SB
GFTAQVILNHPGQISAG	3 P68104	Elongation factor 1- alpha 1	6 48							SB	SB							
AQVILNHPGQISAG	1 P68104 0	Elongation factor 1- alpha 1	6 48						W B	W B			W B	W B	W B	W B	W B	
GFTAQVILNHPGQIS	4 P68104	Elongation factor 1- alpha 1	6 48						SB	SB					SB			
AQVILNHPGQISAG	1 P68104 0	Elongation factor 1- alpha 1	6 48						SB	SB				SB	SB	SB	SB	
AQVILNHPGQISA	5 P68104	Elongation factor 1- alpha 1	6 48							SB					SB	SB	SB	
VILNHPGQISAGY	1 P68104;Q05639	Elongation factor 1- alpha 1; 2																W B
VILNHPGQISAG	4 P68104;Q05639	Elongation factor 1- alpha 1; 2								SB	SB							SB
VILNHPGQISAG	4 P68104;Q05639	Elongation factor 1- alpha 1; 2								SB	SB							SB
VILNHPGQISAG	4 P68104;Q05639	Elongation factor 1- alpha 1; 2								SB	SB							SB
QVILNHPGQISAG	1 P68104;Q05639	Elongation factor 1- alpha 1; 2									SB							
VAHVDDMPNALSALS	1 P69905	Hemoglobin subunit alpha									SB							
VAHVDDMPNALSAL	3 P69905	Hemoglobin subunit alpha									SB							
VAHVDDMPNALSAL	3 P69905	Hemoglobin subunit alpha									SB							
VAHVDDMPNALSALS	2 P69905	Hemoglobin subunit alpha									SB							
VAHVDDMPNALSALSD	2 P69905	Hemoglobin subunit alpha									SB							
NAVAHVDDMPNALSALSD	2 P69905	Hemoglobin subunit alpha									W B							
VAHVDDMPNALSALS	1 P69905	Hemoglobin subunit alpha									SB							
SLDKFLASVSTVLTS	1 P69905	Hemoglobin subunit alpha										SB						
SDYDILSLNIQQHS	1 P78536	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17									SB							
FPEVIIFPDPAQK	2 Q00341	Vigilin	4 6								SB	SB						

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad											
			PSM	MCF-7										
				1	2	3	7	12	14	21	22			
FPEVIHNFDPDAQKS	2 Q00341	Vigilin	4	6			SB	SB						
FPEVIHNFDPDAQKSD	1 Q00341	Vigilin	4	6			SB	SB						
FPEVIHNFDPDAQK	2 Q00341	Vigilin	4	6			W	W						
FPEVIHNFDPDAQKS	2 Q00341	Vigilin	4	6			W	W						
FPEVIHNFDPDAQKSD	1 Q00341	Vigilin	4	6			W	W						
LNTVALVTDNAVYH	2 Q00610	Clathrin heavy chain 1	2	84			W							
VVTGNMGSNDKVGDF	9 Q02413	Desmoglein-1											W	B
VVTGNMGSNDKVGDF	1 Q02413	Desmoglein-1											W	B
ANSFVGTRSYMSPE	2 Q02750	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1												SB
GAGEEALTPSPINK	1 Q02880	DNA topoisomerase 2-beta												SB
SQVILNHPGQISAG	4 Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	6	36				SB		SB				
TSQVILNHPGQISAG	4 Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	6	36				SB		SB				
TSQVILNHPGQIS	4 Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	6	36				SB		SB				
SQVILNHPGQISAG	4 Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	6	36				SB		SB				
TSQVILNHPGQISAG	4 Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	6	36				SB		SB				
TSQVILNHPGQIS	4 Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	6	36				SB		SB				
SQVILNHPGQIS	2 Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	6	36										SB
DGSEIVVAGRLVDEDM	2 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3											W	W
DGSEIVVAGRLVDEDMN	2 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3											W	W
YDGSEIVVAGRLVDE	2 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3											W	W
DGSEIVVAGRLVDEDMN	2 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3											W	W
GSEIVVAGRLVDEDMNS	2 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3											W	W
YDGSEIVVAGRLVDEDM	1 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3											W	W
DGSEIVVAGRLVDE	2 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3											W	W
GSEIVVAGRLVDEDMN	1 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3											W	W
DGSEIVVAGRLVDEDM	2 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3											W	W
DGSEIVVAGRLVDEDM	2 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3											SB	SB

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19)-, alelo y predicción de afinidad															
			MCF-7															
				1	2	3	7	12	14	21	22							
PSM	PSM	PSM	DR*0301	DR*1301	DR*1305	DR*1501	DR*0404	DR*1302	DR*0701	DR*1302	DR*0301	DR*1303	DR*0102	DR*1302	DR*1301	DR*1302	DR*0701	
DGSEIVVAGRLVDEDMN	2 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3										SB	SB					
YDGSEIVVAGRLVDEDMN	2 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3													SB			
YDGSEIVVAGRLVDE	2 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3										SB	SB					
YDGSEIVVAGRLVDEDMN S	2 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3													SB			
DGSEIVVAGRLVDEDMN	2 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3													SB	SB		
DGSEIVVAGRLVDEDMNS	2 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3														SB		
GSEIVVAGRLVDEDMNS	2 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3													SB	SB		
YDGSEIVVAGRLVDEDM	1 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3													SB	SB		
DGSEIVVAGRLVDEDMNS	2 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3														SB		
YDGSEIVVAGRLVDEDMN	1 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3														SB		
DGSEIVVAGRLVDE	2 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3													SB	SB		
DGSEIVVAGRLVDEDMNS F	2 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3														SB		
GSEIVVAGRLVDEDMN	1 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3													SB	SB		
DGSEIVVAGRLVDEDM	2 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3													SB	SB		
DGSEIVVAGRLVDEDMNS F	1 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3														SB		
YDGSEIVVAGRLVDEDMN S	1 Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3														SB		
VDENMVIDETLDVKE	1 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4								W	W					W
												B	B					B
VDENMVIDETLDVK	5 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4								W	W					W
												B	B					B
VDENMVIDETLDVK	5 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4								SB	SB					SB
ENMVIDETLDVKEM	3 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4											SB			
DENMVIDETLDVK	2 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4											SB	SB		
VDENMVIDETLDVKEM	3 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4											SB	SB		
ENMVIDETLDVKE	2 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4												SB		
ENMVIDETLDVK	3 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4												SB		
DENMVIDETLDVKE	2 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4												SB		
NKVDENMVIDETLDVKE	2 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4												SB		

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad													
			PSM	MCF-7		1	2	3	7	12	14	21	22			
				Peptid	PSM											
			DR*03:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01
GPIREDFSLSSALIG	1 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4				SB								
VDENMVIDETLDVK	5 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4	SB					SB	SB					SB
ENMVIDETLDVKEM	3 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4	SB					SB						
DENMVIDETLDVK	2 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4	SB					SB	SB					
VDENMVIDETLDVKEM	3 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4	SB					SB	SB					
ENMVIDETLDVKE	2 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4	SB					SB						
ENMVIDETLDVK	3 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4	SB					SB						
VDENMVIDETLDVKEM	1 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4	SB					SB	SB					
VDENMVIDETLDVKE	1 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4						SB	SB					SB
NKVDENMVIDETLDVK	1 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4						SB						
VDENMVIDETLDVK	5 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4	W B					W B	W B					W B
DENMVIDETLDVK	2 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4	W B					W B	W B					
VDENMVIDETLDVKEM	3 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4	W B					W B	W B					
VDENMVIDETLDVKEM	1 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4	W B					W B	W B					
VDENMVIDETLDVKE	1 Q06481	Amyloid-like protein 2	3	4						W B	W B					W B
YEQAFQGDESVRIDA	6 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1			W B					W B	W B					W B
FTYFADTTSYLGRQ	3 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1							SB							SB
YEQAFQGDESVRIDA	6 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1			W B					W B	W B					W B
QAFQGDESVRIDAMD	4 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1			W B					W B						
AYEQAFQGDESVRIDA	2 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1			W B					W B	W B					
EPRALVVDVQNGYLY	3 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1						SB					SB			
EPRALVVDVQNGYLYW	4 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1						SB					SB			
QAFQGDESVRIDAM	3 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1			W B					W B	W B					

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad													
				1	2	3	7	12	14	21	22						
PSM			Péptid PSM	DR*0301	DR*1301	DR*1305	DR*1501	DR*0404	DR*1302	DR*0701	DR*1302	DR*0301	DR*1303	DR*0102	DR*1302	DR*1301	DR*1302
EPRALVVDVQNGYL	3 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	SB								SB						
MPRGLAIDWVAGNVY	2 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	W B									W B					
EPRALVVDVQNGYLYWT	3 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	SB									SB					
EQAFQGDESVRIDA	2 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	W B														
WPNGLSLDIPAGRLY	1 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	SB														
NPKGIALDPAMGKVF	1 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	SB														
EPRALVVDVQNGYLYWTD	2 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	SB														
FGNIQQINDGSR	2 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1									SB						
FIYFADTTSYLIGRQ	3 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1									SB						SB
YEQAFQGDESVRIDA	6 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	W B									W B	W B			W B	
QAFQGDESVRIDAMD	4 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	W B									W B					
AYEQAFQGDESVRIDA	2 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	W B									W B	W B				
EPRALVVDVQNGYLY	3 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	SB									SB					
EPRALVVDVQNGYLYW	4 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	SB									SB					
QAFQGDESVRIDAM	3 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	W B									W B	W B				

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad											
			PSM	MCF-7										
					1	2	3	7	12	14	21	22		
Peptid PSM	DR*E3:01	DR*E3:05	DR*E5:01	DR*E4:04	DR*E3:02	DR*E7:01	DR*E3:02	DR*E3:01	DR*E3:03	DR*E1:02	DR*E3:02	DR*E3:01	DR*E3:02	DR*E7:01
EPRALVVDVQNGYL	3 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	SB					SB						
MPRGIAIDWVAGNVY	2 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	W B					W B						
EPRALVVDVQNGYLYWT	3 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	SB					SB						
SAYEQAFQGDESVRIDA	2 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1						W B	W B					
MPRGIAIDWVAGNVY	1 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	W B					W B						
QAFQGDESVRIDA	1 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1						W B	W B					
YEQAFQGDESVRIDA	6 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	W B					W B	W B				W B	
AYEQAFQGDESVRIDA	2 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	W B					W B	W B					
QAFQGDESVRIDAM	3 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	W B					W B	W B					
SAYEQAFQGDESVRIDA	2 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1						W B	W B					
QAFQGDESVRIDA	1 Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1						W B	W B					
EAISQNSVVIHR	1 Q08211	ATP-dependent RNA helicase A	4	6				W B						
VLKPVDPDGPENGPP	1 Q08554	Desmocollin-1						W B						
GTPGFLQVHTPPVP	2 Q12913	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta						SB	SB					SB
GTPGFLQVHTPPVP	2 Q12913	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta						SB	SB					SB
GTPGFLQVHTPPVP	2 Q12913	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta						W B	W B					W B
INSEYFQYPANIHK	2 Q13093	Platelet-activating factor acetylhydrolase						SB						

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad															
				1	2	3	7	12	14	21	22								
	PSM		Péptid PSM	DR*0301	DR*1301	DR*1305	DR*1501	DR*0404	DR*1302	DR*0701	DR*1302	DR*0301	DR*1303	DR*0102	DR*1302	DR*1301	DR*1302	DR*0701	
ALKDIVINANPASPL	3 Q13155	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2		W B	W B	W B	W B												
ALKDIVINANPASPL	3 Q13155	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2		W B	W B	W B	W B												
ALKDIVINANPASPL	3 Q13155	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2		W B	W B	W B	W B												
KDIVINANPASPL	1 Q13155	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2				W B	W B												
ALKDIVINANPASPL	3 Q13155	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2		W B	W B	W B	W B												
KDIVINANPASPL	1 Q13155	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2				W B	W B												
INNAIDFIQDNYALK	2 Q13201	Multimerin-1						SB											
STTEDYNLIVIERGAAAA	1 Q13263	Transcription intermediary factor 1-beta	1 36 2									W B							
EGTNFVVDQSQAVK	4 Q13418	Integrin-linked protein kinase		SB							SB SB								
EGTNFVVDQSQAVK	4 Q13418	Integrin-linked protein kinase		SB							SB SB								
EGTNFVVDQSQAVK	4 Q13418	Integrin-linked protein kinase		SB							SB SB								
SGPTYNEMNTALRDG	1 Q13443	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9				W B													
VVLPSYEEALSLPSKTPE	2 Q13571	Lysosomal-associated transmembrane protein 5								W B									
DDSGIDLQNSEGRAG	1 Q13651	Interleukin-10 receptor subunit alpha						SB											
VHNVVQLLPGVGTFYN	1 Q13790	Apolipoprotein F													SB				
EKLNLVNMNNIENYV	1 Q14314	Fibroleukin						SB											
EKLNLVNMNNIENYV	1 Q14314	Fibroleukin						SB											
LEKLNLVNMNNIENYVDS	1 Q14314	Fibroleukin						SB											
VDTGIGMTKADLINN	3 Q14568	Heat shock protein HSP 90-alpha A2									SB SB								SB
VDTGIGMTKADLINN	3 Q14568	Heat shock protein HSP 90-alpha A2									SB SB								SB
VDTGIGMTKADLNNL	2 Q14568	Heat shock protein HSP 90-alpha A2								SB									

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad												
			PSM	MCF-7											
				1	2	3	7	12	14	21	22				
Péptid	PSM	DR*03:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01
VDTGIGMTKADLNNLG	1 Q14568	Heat shock protein HSP 90-alpha A2					SB								
VDTGIGMTKADLINN	3 Q14568	Heat shock protein HSP 90-alpha A2					W B	W B							W B
NVVFVIDKSGSMSGR	2 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	W B	W B										W B	W B
NVVFVIDKSGSMSG	3 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	W B	W B					W B	W B				W B	W B
NVVFVIDKSGSMSGR	2 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	SB	SB										SB	SB
NVVFVIDKSGSMSG	3 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	SB	SB					SB	SB				SB	SB
GPDVLTATVSGKLPDQ	1 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4													SB
NVVFVIDKSGSMS	1 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	SB												
MPKNVVFVIDKSGSMSG	1 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	W B	W B											
NVVFVIDKSGSMSG	4 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	SB	SB					SB	SB				SB	SB
NVVFVIDKSGSMSGR	2 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	SB	SB										SB	SB
VVFVIDKSGSMSG	2 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	W B												
NVVFVIDKSGSM	1 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	W B												
NVVFVIDKSGSMS	2 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	SB												
MPKNVVFVIDKSGSMSG	1 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	W B	W B											
NVVFVIDKSGSMSG	4 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	W B	W B					W B	W B				W B	W B
NVVFVIDKSGSMSGR	2 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	W B	W B										W B	W B
EALIKILDDLSPR	2 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4				SB									
DAMLMAVQLLDSSNQEER	2 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4				W B									
NVVFVIDKSGSMSG	4 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	SB	SB					SB	SB				SB	SB
GSEMVAAGKIQDRGPD	2 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4							W B	W B					
NVVFVIDKSGSMSG	4 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	SB	SB					SB	SB				SB	SB
GSEMVAAGKIQDRGPDV	2 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4									SB				
GSEMVAAGKIQDRGPDV	1 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4									SB				

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad										
				Péptido PSM	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad									
					1	2	3	7	12	14	21	22		
GSEMVVAGKIQDRGPD	2 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4							SB	SB				
IQAPSAILPLPGQSVER	1 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4									SB	SB		
APSAILPLPGQSVERL	1 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4									SB	SB		
APSAILPLPGQSVER	1 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4									SB	SB		
IQAPSAILPLPGQSVER	1 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4									W	W	B	B
APSAILPLPGQSVERL	1 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4									W	W	B	B
APSAILPLPGQSVER	1 Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4									SB	SB		
TAQGELFLDDGHTFN	3 Q14697	Neutral alpha-glucosidase AB	6	14	W					W				
TAQGELFLDDGHTFN	3 Q14697	Neutral alpha-glucosidase AB	6	14	W					W				
LKSTLITDGSTPINL	2 Q14764	Major vault protein	5	11	W									W
LKSTLITDGSTPIN	2 Q14764	Major vault protein	5	11	B									B
KSTLITDGSTPINL	1 Q14764	Major vault protein	5	11										W
LKSTLITDGSTPINL	2 Q14764	Major vault protein	5	11	W									W
KSTLITDGSTPIN	1 Q14764	Major vault protein	5	11	B					W				B
LPQQHISQVTPPLSSQS	2 Q14766	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1						SB						
VPIAQVKDVYVVTQ	2 Q14956	Transmembrane glycoprotein NMB						W						
VLPTIYEMAVKMPEKEPPPP	1 Q15012	Lysosomal-associated transmembrane protein 4A									SB			
GPEGQAYDVDFTPPFR	2 Q15046	Lysine--tRNA ligase	6	11	W									B
TIKDIAVEEDLSSTPL	1 Q15080	Neutrophil cytosol factor 4						SB						
TGGLIEPDTGRVPLD	4 Q15149	Plectin	4	80	SB					SB	SB			
LTGGLIEPDTGRVPLDE	1 Q15149	Plectin	4	80	SB									
GGLIEPDTGRVPLDEA	1 Q15149	Plectin	4	80	SB									
TGGLIEPDTGRVPLD	4 Q15149	Plectin	4	80	W					W	W			B
TGGLIEPDTGRVP	2 Q15149	Plectin	4	80	B					W	B			
GGLIEPDTGRVPLD	2 Q15149	Plectin	4	80						W	B			
TGGLIEPDTGRVPLD	4 Q15149	Plectin	4	80	SB					SB	SB			
GGLIEPDTGRVPLDE	1 Q15149	Plectin	4	80								SB		

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad														
			PSM	MCF-7													
				1	2	3	7	12	14	21	22						
Peptid	PSM	DR*E3:01	DR*E3:01	DR*E3:05	DR*E5:01	DR*E4:04	DR*E3:02	DR*E7:01	DR*E3:02	DR*E3:01	DR*E3:03	DR*E1:02	DR*E3:02	DR*E3:01	DR*E3:02	DR*E7:01	
MPNFAPDEPGKIF	1 Q15166	Serum paraoxonase/lactonase 3															W B
IDEGETDWKVIAINVDDP DA	2 Q15181	Inorganic pyrophosphatase	4	7													W B
TERAHTIAGVPQSVTE	1 Q15365	Poly(rC)-binding protein 1	5	17													SB
IDKVISTITNNIQQ	8 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3															SB SB SB SB
KVISTITNNIQQ	2 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3															SB
IDKVISTITNNIQI	3 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3															SB SB
IDKVISTITNNIQQ	8 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3															SB SB SB SB
IDKVISTITNNIQ	3 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3															SB SB SB SB
LIDKVISTITNNIQQ	2 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3															SB SB SB SB
KVISTITNNIQQIIE	3 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3															SB SB SB
IDKVISTITNNIQQII	2 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3															SB SB
GVVHVITNVLQPPA	3 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3															SB
TNGVVHVITNVLQPPA	2 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3															SB SB
KVISTITNNIQQI	2 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3															SB
NGVVHVITNVLQPP	1 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3															SB SB
IDKVISTITNNIQQIIE	1 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3															SB SB

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad													
				1	2	3	7	12	14	21	22						
	PSM		Péptid PSM	DR*03/01	DR*13/01	DR*13/05	DR*15/01	DR*04/04	DR*13/02	DR*07/01	DR*13/02	DR*03/01	DR*13/03	DR*01/02	DR*13/02	DR*13/01	DR*07/01
GVVHVITNVLP	1 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3						SB									
KVISTITNNIQII	1 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3						SB									
IDKVISTITNNIQI	3 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3						W B	W B								
IDKVISTITNNIQQ	8 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3						W B	W B	W B	W B						W B
IDKVISTITNNIQ	3 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3						W B	W B	W B	W B						
LIDKVISTITNNIQQ	2 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3						W B	W B	W B	W B						
KVISTITNNIQIIE	3 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3						W B	W B	W B							
IDKVISTITNNIQII	2 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3						W B	W B								
TNGVVHVITNVLP	2 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3						W B	W B								
NGVVHVITNVLP	1 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3						W B	W B								
IDKVISTITNNIQIIE	1 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3						W B	W B								
IDKVISTITNNIQQ	8 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3						SB SB	SB SB								SB
IDKVISTITNNIQ	3 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3						SB SB	SB SB								
LIDKVISTITNNIQQ	2 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3						SB SB	SB SB								
LIDKVISTITNNIQ	2 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3								SB SB							

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad													
			PSM	MCF-7												
				1	2	3	7	12	14	21	22					
Peptid PSM	DR*03:01	DR*13:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01	
EPDIMATNGVVHVIT	1 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3						W B	W B							
APTNEAFEKIPSETLN	1 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3							SB							
IDKVISTITNNIQ	8 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3					W B	W B	W B	W B					W B	
IDKVISTITNNIQ	3 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3					W B	W B	W B	W B						
LIDKVISTITNNIQ	2 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3					W B	W B	W B	W B						
KVISTITNNIQIIE	3 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3					W B	W B	W B							
LIDKVISTITNNIQ	2 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3						W B	W B							
EPDIMATNGVVHVIT	1 Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3						W B	W B							
GGKIVNDDQSFYADIY	2 Q16555	Dihydropyrimidinase-related protein 2	3	6					SB							
GHPNIVINNAAGNFI	1 Q16698	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	2	4	W B	W B										
GHPNIVINNAAGNFI	1 Q16698	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	2	4	W B	W B										
DENAIYFLGNSLGLQPK	2 Q16719	Kynureninase	2	4					SB							
VPIKVEQIEAGTPG	1 Q16881	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	3	4				W B								
FQTLVMLETVPRSGEV	1 Q5Y7A7	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-13 beta chain													W B	
SQKDILEDERA AVDT	2 Q5Y7A7	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-13 beta chain							SB	SB						
KDILEDERA AVDT	1 Q5Y7A7	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-13 beta chain							SB							
SQKDILEDERA AVDT	2 Q5Y7A7	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-13 beta chain						W B	W B							

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad														
			MCF-7														
				1	2	3	7	12	14	21	22						
	PSM		Péptid PSM	DR*03:01	DR*13:01	DR*13:05	DR*15:01	DR*04:04	DR*13:02	DR*07:01	DR*13:02	DR*03:01	DR*13:03	DR*01:02	DR*13:01	DR*13:02	DR*07:01
QTLVMILETVPRSG	1 Q5Y7A7	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-13 beta chain						W B									
NKP1LSALPSPVVASG	1 Q6PI73	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 6													SB SB		
NKP1LSALPSPVVASG	1 Q6PI73	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 6												W B	W B		
AAAVKATQTLQANES	2 Q6PJG2	ELM2 and SANT domain-containing protein 1						SB									
LDFLKAVDTNRSVG	4 Q6UX71	Plexin domain-containing protein 2						SB									
NLDFLKAVDTNRSVG	1 Q6UX71	Plexin domain-containing protein 2						SB									
VPLIERLGTPQQIA	2 Q7L576	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1	1	2				SB									
GKAVTVETLSGQAVVS	1 Q7Z4F1	Low-density lipoprotein receptor-related protein 10													SB		
AVTVETLSGQAVVSYH	1 Q7Z4F1	Low-density lipoprotein receptor-related protein 10													SB		
GNQLFRINEANQL	1 Q86SF2	N-acetylgalactosaminyltransferase 7															SB
DKEGVIEPDTDAPQE	2 Q8IZP2	Putative protein FAM10A4						SB									
KEGVIEPDTDAPQE	2 Q8IZP2	Putative protein FAM10A4						SB									
IDKEGVIEPDTDAPQE	2 Q8IZP2	Putative protein FAM10A4						W B									
EDNDFYINYKDIDLA	1 Q8N386	Leucine-rich repeat-containing protein 25													SB		
DTQPEDGVEMDTRAAASE APQ	2 Q8N423	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 2						SB									
DMARVSTYTNAFAFTQ	2 Q8NB15	Solute carrier family 43 member 3													SB		
VDQIYHLASASPNN	1 Q8NBZ7	UDP-glucuronic acid decarboxylase 1													SB		
SKPTLSALPSPPLVTSG	1 Q8NHJ6	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 4													SB SB		
SKPTLSALPSPPLVTSG	1 Q8NHJ6	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 4													W B	W B	
IPGMVVVADKTSELYQ	2 Q8NHP8	Putative phospholipase B-like 2													SB SB		
IPGMVVVADKTSELYQ	2 Q8NHP8	Putative phospholipase B-like 2													SB SB		

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad														
			PSM	MCF-7													
					1	2	3	7	12	14	21	22					
Pepid	PSM	DR*E3:01	DR*E3:01	DR*E3:05	DR*E5:01	DR*04:04	DR*E3:02	DR*07:01	DR*E3:02	DR*03:01	DR*E3:03	DR*01:02	DR*E3:02	DR*E3:01	DR*E3:02	DR*07:01	
NSLELEDPKAEVVDE	1 Q8TAT6	Nuclear protein localization protein 4 homolog	1	1	SB												
NSLELEDPKAEVVDEIA	2 Q8TAT6	Nuclear protein localization protein 4 homolog	1	1	SB												
NSLELEDPKAEVVDEI	1 Q8TAT6	Nuclear protein localization protein 4 homolog	1	1	SB												
TQNSLELEDPKAEVVD	2 Q8TAT6	Nuclear protein localization protein 4 homolog	1	1				SB									
HGDLLFLFPSSLAGPS	1 Q8TAT6	Nuclear protein localization protein 4 homolog	1	1				SB									
VEVEYVTMASLPKEDI	2 Q8TDQ1	CMRF35-like molecule 1						W									
VEVEYVTMASLPKE	1 Q8TDQ1	CMRF35-like molecule 1						W									
FRQLVSEEDNTSAPS	1 Q8WTW3	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 1	1	2							SB						
DLQQSIAREPSAPSIPTPA	1 Q8WUM4	Programmed cell death 6-interacting protein	4	6							SB						
LQQSIAREPSAPSIPTPA	2 Q8WUM4	Programmed cell death 6-interacting protein	4	6							SB						
QQSIAREPSAPSIPTPA	1 Q8WUM4	Programmed cell death 6-interacting protein	4	6							SB						
QQSIAREPSAPSIPT	1 Q8WUM4	Programmed cell death 6-interacting protein	4	6							SB	SB					
QQSIAREPSAPSIPT	1 Q8WUM4	Programmed cell death 6-interacting protein	4	6						W	W						
DEGAISMLSDNTAK	2 Q8WVM8	Sec1 family domain-containing protein 1									SB						
EDEGAISMLSDNTAK	2 Q8WVM8	Sec1 family domain-containing protein 1									SB						
GEDEGAISMLSDNTAK	1 Q8WVM8	Sec1 family domain-containing protein 1									SB						
DEGAISMLSDNTAK	1 Q8WVM8	Sec1 family domain-containing protein 1									SB						
SPEEDLNFVTDTAKALAD	1 Q92542	Nicastrin															W
EDLNFVTDTAKALAD	2 Q92542	Nicastrin															
EDLNFVTDTAKALADV	1 Q92542	Nicastrin												W	W		
EDLNFVTDTAKALADV	1 Q92542	Nicastrin												W	W		
LDKINPIYDALSYSSPS	2 Q92692	Nectin-2									SB						
LDKINPIYDALSYS	2 Q92692	Nectin-2									SB						
YLDKINPIYDALSYSSPS	2 Q92692	Nectin-2									SB						
ISSMYQTKAVIIAM	1 Q969X1	Protein lifeguard 3															SB

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	MCF-7	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad										
				Péptid PSM	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad									
					1	2	3	7	12	14	21	22		
SMYQTKAVIIAM	1 Q969X1	Protein lifeguard 3					W B							
GGGALVENTTTGISR	1 Q96BW5	Phosphotriesterase-related protein					SB							
ANGGGALVENTTTGISRD T	2 Q96BW5	Phosphotriesterase-related protein					W B							
EAQKILNNSGLPITSA	1 Q96I99	Succinate--CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial	2	2			SB							
TAEILELAGNAARDN	3 Q96KK5	Histone H2A type 1-H					SB							
TAEILELAGNAARD	1 Q96KK5	Histone H2A type 1-H					SB							
LVGKLAASGSITMQNIG	1 Q96QD8	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2					W B							
VGKLAASGSITMQNIG	1 Q96QD8	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2					W B							
EDNSIQTMITFDQGGR	2 Q99523	Sortilin	1	1			SB							
EDNSIQTMITFDQGGR	2 Q99523	Sortilin	1	1			SB							
LPDNINVYATTAANPR	2 Q99538	Legumain					SB	SB						
LPDNINVYATTAANPRE	2 Q99538	Legumain					SB	SB						
LPDNINVYATTAANPR	2 Q99538	Legumain					W B	W B						
LPDNINVYATTAANPRE	2 Q99538	Legumain					W B	W B						
DNPITPGIVINRPNGTDV	1 Q99538	Legumain											SB	
NPITPGIVINRPNGTDV	1 Q99538	Legumain											SB	
EDNPITPGIVINRPNGTDV	2 Q99538	Legumain											SB	
GQRGVIINTASVAAFEG	2 Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	1	3			SB	SB						
QRGVIINTASVAAFEG	2 Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	1	3			SB	SB						
GQRGVIINTASVAAFEG	2 Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	1	3			SB	SB						
QRGVIINTASVAAFEG	2 Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	1	3			SB	SB						
GGTGAIVEYHGPVGVDS	1 Q99798	Aconitate hydratase, mitochondrial	2	2			SB							
DSNTDLVPAPAVRILTPE	1 Q99988	Growth/differentiation factor 15											SB	SB
DSNTDLVPAPAVRILTPE	1 Q99988	Growth/differentiation factor 15											SB	SB
TAVVEPYNSILTTHHT	1 Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain											SB	
EDTESLEIFQNEVAR	2 Q9BS26	Endoplasmic reticulum resident protein 44	2	2			SB							
DTESLEIFQNEVAR	2 Q9BS26	Endoplasmic reticulum resident protein 44	2	2			SB							
EDTESLEIFQNEVARQL	1 Q9BS26	Endoplasmic reticulum resident protein 44	2	2			SB							

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad													
			PSM	MCF-7												
				1	2	3	7	12	14	21	22					
SPNNISGISNPPGTIPR	2 Q9BWW4	Single-stranded DNA-binding protein 3										SB				
AGRLLASSTAASVPN	1 Q9BZZ2	Sialoadhesin										SB	SB			
AGRLLASSTAASVPN	1 Q9BZZ2	Sialoadhesin										W	W			
SPASYVFHPDNAVVA	1 Q9GZU7	Carboxy-terminal domain RNA polymerase II polypeptide A small phosphatase 1												W	W	
SPASYVFHPDNAVVA	1 Q9GZU7	Carboxy-terminal domain RNA polymerase II polypeptide A small phosphatase 1												B	B	
ETTQLTADSHPSYHTDG	3 Q9H3Z4	DnaJ homolog subfamily C member 5										SB			SB	
ETTQLTADSHPSYHTDG	3 Q9H3Z4	DnaJ homolog subfamily C member 5										SB			SB	
QPASATETTQLTADSHPSYHTDG	1 Q9H3Z4	DnaJ homolog subfamily C member 5													SB	
LPGGIVTDETLSTFIQK	6 Q9NPH3	Interleukin-1 receptor accessory protein										SB			SB	SB
LPGGIVTDETLSTFIQKS	2 Q9NPH3	Interleukin-1 receptor accessory protein										SB				
DSLPGGIVTDETLSTFIQK	1 Q9NPH3	Interleukin-1 receptor accessory protein										SB				
DSLPGGIVTDETLSTFIQKS	1 Q9NPH3	Interleukin-1 receptor accessory protein										SB				
LPGGIVTDETLSTFIQK	6 Q9NPH3	Interleukin-1 receptor accessory protein										SB			SB	SB
LPGGIVTDETLSTFIQK	6 Q9NPH3	Interleukin-1 receptor accessory protein										W			W	W
LPGGIVTDETLSTFIQK	6 Q9NPH3	Interleukin-1 receptor accessory protein										B			B	B
GREEIYFLNTNNAFSG	2 Q9NQ79	Cartilage acidic protein 1										SB	SB			
DGREEIYFLNTNNAFSG	1 Q9NQ79	Cartilage acidic protein 1										SB	SB			
REEIYFLNTNNAFSG	1 Q9NQ79	Cartilage acidic protein 1										SB	SB			
GREEIYFLNTNNAFSG	2 Q9NQ79	Cartilage acidic protein 1										SB	SB			
DGREEIYFLNTNNAFSG	1 Q9NQ79	Cartilage acidic protein 1										SB	SB			
REEIYFLNTNNAFSG	1 Q9NQ79	Cartilage acidic protein 1										SB	SB			
EEVVEIDGKQVQQ	1 Q9NU53	Glycoprotein integral membrane protein 1										SB	SB			
EEVVEIDGKQVQQ	1 Q9NU53	Glycoprotein integral membrane protein 1										W			W	W
EEVVEIDGKQVQQ	1 Q9NU53	Glycoprotein integral membrane protein 1										B			B	B
EDEGSDFTENRNLVSPA	1 Q9NUQ3	Gamma-taxilin													W	W
EDEGSDFTENRNLVSPA	1 Q9NUQ3	Gamma-taxilin													B	B
EDEGSDFTENRNLVSPA	1 Q9NUQ3	Gamma-taxilin													SB	SB
NAHENLDDNAQR	1 Q9NXH8	Torsin-4A										SB				
DEKGAFNFDQETVINPE	3 Q9NY33	Dipeptidyl peptidase 3													W	W
DEKGAFNFDQETVINPE	3 Q9NY33	Dipeptidyl peptidase 3													B	B
DEKGAFNFDQETVINPE	3 Q9NY33	Dipeptidyl peptidase 3													W	W
DEKGAFNFDQETVINPE	3 Q9NY33	Dipeptidyl peptidase 3													B	B
DEKGAFNFDQETVINPE	3 Q9NY33	Dipeptidyl peptidase 3													W	W
DEKGAFNFDQETVINPE	3 Q9NY33	Dipeptidyl peptidase 3													B	B

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad													
			PSM	MCF-7												
				1	2	3	7	12	14	21	22					
Péptid	PSM	DR*03/01	DR*13/01	DR*13/05	DR*15/01	DR*04/04	DR*13/02	DR*07/01	DR*13/02	DR*03/01	DR*13/03	DR*01/02	DR*13/02	DR*13/01	DR*13/02	DR*07/01
GIPLDFSSSLGIHK	3 Q9NZM1	Myoferlin	2	2				SB								SB
IPLDFSSSLGIHK	1 Q9NZM1	Myoferlin	2	2												SB
EDDAWSYDINRAVDE	1 Q9NZM1	Myoferlin	2	2	W											B
GIPLDFSSSLGIHK	3 Q9NZM1	Myoferlin	2	2				SB								SB
GIPLDFSSSLGIH	1 Q9NZM1	Myoferlin	2	2				W	B							
INQRILVVDPTSEHE	1 Q9NZQ7	Programmed cell death 1 ligand 1								SB	SB					
INQRILVVDPTSEHE	1 Q9NZQ7	Programmed cell death 1 ligand 1								SB	SB					
EDAGDYKADINTQADPYT	5 Q9UIB8	SLAM family member 5		W						W	W					W
DAGDYKADINTQADPYT	8 Q9UIB8	SLAM family member 5		W	W					B	B					W
DAGDYKADINTQADPY	4 Q9UIB8	SLAM family member 5		W						B	W					W
GDYKADINTQADPYT	3 Q9UIB8	SLAM family member 5								W	W					W
DAGDYKADINTQADPYT	8 Q9UIB8	SLAM family member 5		W	W					B	W					W
EDAGDYKADINTQADPYT	5 Q9UIB8	SLAM family member 5		W						B	W					W
MEDAGDYKADINTQADPYT	5 Q9UIB8	SLAM family member 5		W						B	W					W
EDAGDYKADINTQADPY	4 Q9UIB8	SLAM family member 5		W						B	W					
DAGDYKADINTQADPY	4 Q9UIB8	SLAM family member 5		W						B	W					W
DAGDYKADINTQADPYTT	2 Q9UIB8	SLAM family member 5		W						B	W					B
GDYKADINTQADPY	1 Q9UIB8	SLAM family member 5		W						B	W					
DAGDYKADINTQADP	1 Q9UIB8	SLAM family member 5		W						B						
DAGDYKADINTQADPYT	8 Q9UIB8	SLAM family member 5		W	W					B	B					W
DAGDYKADINTQADPYT	8 Q9UIB8	SLAM family member 5		W	W					B	B					W
EDAGDYKADINTQADPYT	5 Q9UIB8	SLAM family member 5		W						B	W					W
MEDAGDYKADINTQADPYT	5 Q9UIB8	SLAM family member 5		W						B	W					B
EDAGDYKADINTQADPY	4 Q9UIB8	SLAM family member 5		W						B	W					W
DAGDYKADINTQADPY	4 Q9UIB8	SLAM family member 5		W						B	W					B
DAGDYKADINTQADPYTT	2 Q9UIB8	SLAM family member 5		W						B	W					
GDYKADINTQADPYT	3 Q9UIB8	SLAM family member 5								W	W					W
DAGDYKADINTQADPYT	8 Q9UIB8	SLAM family member 5		W	W					B	B					W
EDAGDYKADINTQADPYT	5 Q9UIB8	SLAM family member 5		W						B	W					W
MEDAGDYKADINTQADPYT	5 Q9UIB8	SLAM family member 5		W						B	W					B
EDAGDYKADINTQADPY	4 Q9UIB8	SLAM family member 5		W						B	W					

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad												
			PSM	MCF-7											
				1	2	3	7	12	14	21	22				
DAGDYKADINTQADPY	4 Q9UIB8	SLAM family member 5	SB					SB	SB				SB		
DAGDYKADINTQADPYTT	2 Q9UIB8	SLAM family member 5	W B					W B	W B						
GDYKADINTQADPYT	3 Q9UIB8	SLAM family member 5						W B	W B				W B		
DAGDYKADINTQA	2 Q9UIB8	SLAM family member 5								W B					
APIIININRAQLTNPE	4 Q9UIW2	Plexin-A1	SB	SB	SB	SB							SB	SB	
APIIININRAQLTNPE	4 Q9UIW2	Plexin-A1	SB	SB	SB	SB							SB	SB	
APIIININRAQLTNPE	4 Q9UIW2	Plexin-A1	W B	W B	W B	W B							W B	W B	
APIIININRAQLTNPE	4 Q9UIW2	Plexin-A1	SB	SB	SB	SB							SB	SB	
APIIININRAQLTNPE	4 Q9UIW2	Plexin-A1	SB	SB	SB	SB							SB	SB	
APIIININRAQLTNPE	4 Q9UIW2	Plexin-A1	W B	W B	W B	W B							W B	W B	
YQAVRAEPTNPS	1 Q9ULZ3	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	1	1				W B							
NPDTLSAMSNPRAMQ	2 Q9UMX0	Ubiquilin-1	1	2			SB								
NPDTLSAMSNPRAMQ	4 Q9UMX0	Ubiquilin-1	1	2			SB								
DTLSAMSNPRAMQ	2 Q9UMX0	Ubiquilin-1	1	2			SB								
NPDTLSAMSNPRAMQA	2 Q9UMX0	Ubiquilin-1	1	2			SB								
NPDTLSAMSNPRAM	1 Q9UMX0	Ubiquilin-1	1	2			SB								
NPDTLSAMSNPRA	1 Q9UMX0	Ubiquilin-1	1	2			SB								
NPDTLSAMSNPRAMQA	1 Q9UMX0	Ubiquilin-1	1	2			SB								
APAALYQITEENIK	4 Q9Y287	Integral membrane protein 2B						W B						W B	
DAPAALYQITEENIK	4 Q9Y287	Integral membrane protein 2B						W B						W B	
IKDDVILNEPSADAPAA	2 Q9Y287	Integral membrane protein 2B					SB	SB							
IKDDVILNEPSADAPA	2 Q9Y287	Integral membrane protein 2B					SB	SB							
KDDVILNEPSADAPA	4 Q9Y287	Integral membrane protein 2B					SB	SB							
KDDVILNEPSADAPAA	2 Q9Y287	Integral membrane protein 2B					SB	SB							
YIKDDVILNEPSADAPA	2 Q9Y287	Integral membrane protein 2B					SB	SB							
YIKDDVILNEPSADAPAA	2 Q9Y287	Integral membrane protein 2B					SB	SB							
IKDDVILNEPSADAPAA	2 Q9Y287	Integral membrane protein 2B					W B	W B							
IKDDVILNEPSADAPA	2 Q9Y287	Integral membrane protein 2B					W B	W B							
KDDVILNEPSADAPA	4 Q9Y287	Integral membrane protein 2B					W B	W B							
KDDVILNEPSADAPAA	2 Q9Y287	Integral membrane protein 2B					W B	W B							

Anexos. Capítulo III

Secuencia	Identificador	Descripción	Muestra (DC19-), alelo y predicción de afinidad									
			MCF-7		1	2	3	7	12	14	21	22
	PSM		Péptid PSM									
YIKDDVILNEPSADAPA	2 Q9Y287	Integral membrane protein 2B					W B	W B				
YIKDDVILNEPSADAAA	2 Q9Y287	Integral membrane protein 2B					W B	W B				
APAALYQTHEENIK	4 Q9Y287	Integral membrane protein 2B					W B					W B
VPVPEFADSDPANIVHD	2 Q9Y287	Integral membrane protein 2B						SB				
DAPAALYQTHEENIK	4 Q9Y287	Integral membrane protein 2B					W B					W B
VPVPEFADSDPANIVH	1 Q9Y287	Integral membrane protein 2B					W B					
AEGLRMATNAAAQN	1 Q9Y490	Talin-1	8	9			SB	SB				
AAEGLRMATNAAAQN	1 Q9Y490	Talin-1	8	9			SB	SB				
AEGLRMATNAAAQN	1 Q9Y490	Talin-1	8	9			SB	SB				
AEGLRMATNAAAQN	1 Q9Y490	Talin-1	8	9			W B	W B				
AAEGLRMATNAAAQN	1 Q9Y490	Talin-1	8	9			W B	W B				
AEGLRMATNAAAQN	1 Q9Y490	Talin-1	8	9			W B	W B				
DNYNKILQLDPGGLVV	1 Q9Y4D7	Plexin-D1					W B					
LKVLQLINDNTATA	2 Q9Y4L1	Hypoxia up-regulated protein 1	4	6			SB					
APVPQVAFSAALS LPR	1 Q9Y6C2	EMILIN-1										SB
EGNAIFTFPNTPVK	2 Q9Y6N5	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial						SB				

Bibliografia

1. Breast cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>.
2. Bray, F. *et al.* Cancer Incidence in Five Continents: Inclusion criteria, highlights from Volume X and the global status of cancer registration. *Int J Cancer* **137**, 2060–2071 (2015).
3. Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M. & Jemal, A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **25**, 16–27 (2016).
4. Ginsburg, O. *et al.* The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health. *Lancet* **389**, 847–860 (2017).
5. Harbeck, N. *et al.* Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers* **5**, (2019).
6. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
7. Lachapelle, J. & Foulkes, W. D. Triple-negative and basal-like breast cancer: implications for oncologists. *Curr Oncol* **18**, 161–164 (2011).
8. Toft, D. J. & Cryns, V. L. Minireview: Basal-Like Breast Cancer: From Molecular Profiles to Targeted Therapies. *Mol Endocrinol* **25**, 199–211 (2011).
9. Prat, A. *et al.* Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist* **18**, 123–133 (2013).
10. Hankinson, S. E., Colditz, G. A. & Willett, W. C. Towards an integrated model for breast cancer etiology: The lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. *Breast Cancer Res* **6**, 213–218 (2004).
11. Dorgan, J. F. *et al.* Serum hormones and the alcohol-breast cancer association in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* **93**, 710–715 (2001).
12. Reichman, M. E. *et al.* Effects of alcohol consumption on plasma and urinary hormone concentrations in premenopausal women. *J Natl Cancer Inst* **85**, 722–727 (1993).
13. Britt, K., Ashworth, A. & Smalley, M. Pregnancy and the risk of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **14**, 907–933 (2007).
14. Shiovitz, S. & Korde, L. A. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann Oncol* **26**, 1291–1299 (2015).

Bibliografía

15. Hall, J. M. *et al.* Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* **250**, 1684–1689 (1990).
16. Wooster, R. *et al.* Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* **265**, 2088–2090 (1994).
17. FitzGerald, M. G. *et al.* Germline mutations in PTEN are an infrequent cause of genetic predisposition to breast cancer. *Oncogene* **17**, 727–731 (1998).
18. Tan, M.-H. *et al.* Lifetime Cancer Risks in Individuals with Germline PTEN Mutations. *Clin Cancer Res* **18**, 400–407 (2012).
19. Garber, J. E. *et al.* Follow-up study of twenty-four families with Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Res* **51**, 6094–6097 (1991).
20. Rapakko, K. *et al.* Germline TP53 alterations in Finnish breast cancer families are rare and occur at conserved mutation-prone sites. *Br J Cancer* **84**, 116–119 (2001).
21. Birch, J. M. *et al.* Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. *Oncogene* **20**, 4621–4628 (2001).
22. Pharoah, P. D., Guilford, P., Caldas, C., & International Gastric Cancer Linkage Consortium. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology* **121**, 1348–1353 (2001).
23. Boardman, L. A. *et al.* Increased risk for cancer in patients with the Peutz-Jeghers syndrome. *Ann Intern Med* **128**, 896–899 (1998).
24. Cortazar, P. *et al.* Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *The Lancet* **384**, 164–172 (2014).
25. Baselga, J. *et al.* Buparlisib plus fulvestrant versus placebo plus fulvestrant in postmenopausal, hormone receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (BELLE-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **18**, 904–916 (2017).
26. André, F. *et al.* Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* **380**, 1929–1940 (2019).
27. Dent, S. *et al.* Phase III randomized study of taselisib or placebo with fulvestrant in estrogen receptor-positive, PIK3CA-mutant, HER2-negative, advanced breast cancer: the SANDPIPER trial. *Ann Oncol* **32**, 197–207 (2021).
28. Kim, S.-B. *et al.* Ipatasertib plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer (LOTUS): a multicentre,

- randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol* **18**, 1360–1372 (2017).
29. Schmid, P. *et al.* AZD5363 plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer (PAKT): A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase II trial. *JCO* **36**, 1007–1007 (2018).
30. Jones, R. H. *et al.* Fulvestrant plus capivasertib versus placebo after relapse or progression on an aromatase inhibitor in metastatic, oestrogen receptor-positive breast cancer (FAKTION): a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol* **21**, 345–357 (2020).
31. Yardley, D. A. *et al.* Randomized phase II, double-blind, placebo-controlled study of exemestane with or without entinostat in postmenopausal women with locally recurrent or metastatic estrogen receptor-positive breast cancer progressing on treatment with a nonsteroidal aromatase inhibitor. *J Clin Oncol* **31**, 2128–2135 (2013).
32. Ogitani, Y. *et al.* DS-8201a, A Novel HER2-Targeting ADC with a Novel DNA Topoisomerase I Inhibitor, Demonstrates a Promising Antitumor Efficacy with Differentiation from T-DM1. *Clin Cancer Res* **22**, 5097–5108 (2016).
33. Tamura, K. *et al.* Trastuzumab deruxtecan (DS-8201a) in patients with advanced HER2-positive breast cancer previously treated with trastuzumab emtansine: a dose-expansion, phase 1 study. *Lancet Oncol* **20**, 816–826 (2019).
34. Bang, Y. J. *et al.* First-in-human phase 1 study of margetuximab (MGAH22), an Fc-modified chimeric monoclonal antibody, in patients with HER2-positive advanced solid tumors. *Ann Oncol* **28**, 855–861 (2017).
35. Rugo, H. S. *et al.* Efficacy of Margetuximab vs Trastuzumab in Patients With Pretreated ERBB2-Positive Advanced Breast Cancer: A Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* **7**, 573–584 (2021).
36. Hyman, D. M. *et al.* HER kinase inhibition in patients with HER2- and HER3-mutant cancers. *Nature* **554**, 189–194 (2018).
37. Saura, C. *et al.* Neratinib Plus Capecitabine Versus Lapatinib Plus Capecitabine in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Previously Treated With ≥ 2 HER2-Directed Regimens: Phase III NALA Trial. *J Clin Oncol* **38**, 3138–3149 (2020).
38. Zhang, Q. *et al.* Exploratory clinical study of chidamide, an oral subtype-selective histone deacetylase inhibitor, in combination with exemestane in hormone receptor-positive advanced breast cancer. *Chin J Cancer Res* **30**, 605–612 (2018).
39. Hölzel, D. *et al.* Improved systemic treatment for early breast cancer improves cure rates, modifies metastatic pattern and shortens post-metastatic

- survival: 35-year results from the Munich Cancer Registry. *J Cancer Res Clin Oncol* **143**, 1701–1712 (2017).
40. Li, Y. *et al.* Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. *J Hematol Oncol* **15**, 121 (2022).
41. Cortes, J. *et al.* Pembrolizumab plus Chemotherapy in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* **387**, 217–226 (2022).
42. Galluzzi, L. *et al.* Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget* **5**, 12472–12508 (2014).
43. Markowitz, L. E. & Schiller, J. T. Human Papillomavirus Vaccines. *The Journal of Infectious Diseases* **224**, S367–S378 (2021).
44. Krummel, M. F. & Allison, J. P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* **182**, 459–465 (1995).
45. Chambers, C. A., Sullivan, T. J. & Allison, J. P. Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4+ T cells. *Immunity* **7**, 885–895 (1997).
46. Allison, J. P. & Krummel, M. F. The Yin and Yang of T cell costimulation. *Science* **270**, 932–933 (1995).
47. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. & Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* **11**, 3887–3895 (1992).
48. Shinohara, T., Taniwaki, M., Ishida, Y., Kawaichi, M. & Honjo, T. Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). *Genomics* **23**, 704–706 (1994).
49. Nishimura, H. *et al.* Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes. *Int Immunol* **8**, 773–780 (1996).
50. Agata, Y. *et al.* Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* **8**, 765–772 (1996).
51. Robert, C. A decade of immune-checkpoint inhibitors in cancer therapy. *Nat Commun* **11**, 3801 (2020).
52. Robert, C. *et al.* Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine* **372**, 2521–2532 (2015).
53. Larkin, J. *et al.* Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* **381**, 1535–1546 (2019).

54. Sun, Q. *et al.* T-cell receptor gene therapy targeting melanoma-associated antigen-A4 by silencing of endogenous TCR inhibits tumor growth in mice and human. *Cell Death and Disease* **10**, (2019).
55. Gatti-Mays, M. E. *et al.* If we build it they will come: targeting the immune response to breast cancer. *npj Breast Cancer* **5**, 1–13 (2019).
56. De Rose, F. *et al.* Rethinking breast cancer follow-up based on individual risk and recurrence management. *Cancer Treat Rev* **109**, 102434 (2022).
57. Cortés, J. *et al.* Trastuzumab Deruxtecan versus Trastuzumab Emtansine for Breast Cancer. *N Engl J Med* **386**, 1143–1154 (2022).
58. Modi, S. *et al.* Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* **382**, 610–621 (2020).
59. Murthy, R. K. *et al.* Tucatinib, Trastuzumab, and Capecitabine for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med* **382**, 597–609 (2020).
60. Swain, S. M. *et al.* Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA): end-of-study results from a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *The Lancet Oncology* **21**, 519–530 (2020).
61. Bardia, A. *et al.* Sacituzumab govitecan, a Trop-2-directed antibody-drug conjugate, for patients with epithelial cancer: final safety and efficacy results from the phase I/II IMMU-132-01 basket trial. *Annals of Oncology* **32**, 746–756 (2021).
62. Miles, D. *et al.* Primary results from IMpassion131, a double-blind, placebo-controlled, randomised phase III trial of first-line paclitaxel with or without atezolizumab for unresectable locally advanced/metastatic triple-negative breast cancer. *Annals of Oncology* **32**, 994–1004 (2021).
63. Schmid, P. *et al.* Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* **21**, 44–59 (2020).
64. Cortes, J. *et al.* Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *The Lancet* **396**, 1817–1828 (2020).
65. Robson, M. E. *et al.* OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician’s choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer. *Annals of Oncology* **30**, 558–566 (2019).

66. Diéras, V. *et al.* Veliparib with carboplatin and paclitaxel in BRCA-mutated advanced breast cancer (BROCADE3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* **21**, 1269–1282 (2020).
67. Li, Y. *et al.* Recent Progress on Immunotherapy for Breast Cancer: Tumor Microenvironment, Nanotechnology and More. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **9**, (2021).
68. Wesolowski, J., Tankiewicz-Kwedlo, A. & Pawlak, D. Modern Immunotherapy in the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel)* **14**, 3860 (2022).
69. Zagami, P. & Carey, L. A. Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. *NPJ Breast Cancer* **8**, 95 (2022).
70. Denkert, C. *et al.* Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *The Lancet Oncology* **19**, 40–50 (2018).
71. Loi, S. *et al.* Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. *J Clin Oncol* **37**, 559–569 (2019).
72. Dieci, M. V. *et al.* Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immunology Biomarker Working Group on Breast Cancer. *Seminars in Cancer Biology* **52**, 16–25 (2018).
73. Luen, S. J. *et al.* Tumour-infiltrating lymphocytes in advanced HER2-positive breast cancer treated with pertuzumab or placebo in addition to trastuzumab and docetaxel: a retrospective analysis of the CLEOPATRA study. *Lancet Oncol* **18**, 52–62 (2017).
74. Salgado, R. *et al.* The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol* **26**, 259–271 (2015).
75. Zacharakis, N. *et al.* Immune recognition of somatic mutations leading to complete durable regression in metastatic breast cancer. *Nat Med* **24**, 724–730 (2018).
76. Zhang, Y. *et al.* Adjuvant treatment for triple-negative breast cancer: a retrospective study of immunotherapy with autologous cytokine-induced killer cells in 294 patients. *Cancer Biol Med* **16**, 350–360 (2019).

77. Xu, L., Xu, W., Qiu, S. & Xiong, S. Enrichment of CCR6+Foxp3+ regulatory T cells in the tumor mass correlates with impaired CD8+ T cell function and poor prognosis of breast cancer. *Clinical Immunology* **135**, 466–475 (2010).
78. Savas, P. *et al.* Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol* **13**, 228–241 (2016).
79. Sánchez-Escamilla, M., San Segundo, L. Y., Urbano-Ispizua, Á. & Perales, M.-A. CAR T cells: The future is already present. *Med Clin (Barc)* **152**, 281–286 (2019).
80. Sadelain, M. Chimeric Antigen Receptors: A Paradigm Shift in Immunotherapy. *Annual Review of Cancer Biology* **1**, 447–466 (2017).
81. Qu, X. *et al.* Phase 1 study of C-CAR088, a novel humanized anti-BCMA CAR T-cell therapy in relapsed/refractory multiple myeloma. *J Immunother Cancer* **10**, e005145 (2022).
82. Neelapu, S. S. *et al.* Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* **377**, 2531–2544 (2017).
83. Simmons, G. L. & Castaneda Puglianini, O. T-Cell-Based Cellular Immunotherapy of Multiple Myeloma: Current Developments. *Cancers (Basel)* **14**, 4249 (2022).
84. Maude, S. L., Teachey, D. T., Porter, D. L. & Grupp, S. A. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **125**, 4017–4023 (2015).
85. Merckenschlager, M. *et al.* How many thymocytes audition for selection? *J Exp Med* **186**, 1149–1158 (1997).
86. Alberts, B. *et al.* Helper T Cells and Lymphocyte Activation. *Molecular Biology of the Cell. 4th edition* (2002).
87. Kumar, B. V., Connors, T. & Farber, D. L. Human T cell development, localization, and function throughout life. *Immunity* **48**, 202–213 (2018).
88. Alcover, A., Alarcón, B. & Di Bartolo, V. Cell Biology of T Cell Receptor Expression and Regulation. *Annual Review of Immunology* **36**, 103–125 (2018).
89. Mariuzza, R. A., Agnihotri, P. & Orban, J. The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma. *J Biol Chem* **295**, 914–925 (2020).
90. Schatz, D. G. & Ji, Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat Rev Immunol* **11**, 251–263 (2011).
91. Blom, B. *et al.* TCR gene rearrangements and expression of the pre-T cell receptor complex during human T-cell differentiation. *Blood* **93**, (1999).

92. Rossjohn, J. *et al.* T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules. *Annual Review of Immunology* **33**, (2015).
93. Kedzierska, K. & Koutsakos, M. The ABC of major histocompatibility complexes and T cell receptors in health and disease. *Viral Immunology* **33**, (2020).
94. Mariuzza, R. A., Agnihotri, P. & Orban, J. The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma. *The Journal of Biological Chemistry* **295**, 914 (2020).
95. Morath, A. & Schamel, W. W. $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell receptors: Similar but different. *Journal of leukocyte biology* **107**, 1045–1055 (2020).
96. Rudolph, M. G., Stanfield, R. L. & Wilson, I. A. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annual review of immunology* **24**, 419–466 (2006).
97. Rossjohn, J. *et al.* T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules. *Annual review of immunology* **33**, 169–200 (2015).
98. Hennecke, J. & Wiley, D. C. T cell receptor-MHC interactions up close. *Cell* **104**, 1–4 (2001).
99. Arstila, T. P. *et al.* A direct estimate of the human $\alpha\beta$ T cell receptor diversity. *Science* **286**, (1999).
100. Attaf, M., Huseby, E. & Sewell, A. K. $\alpha\beta$ T cell receptors as predictors of health and disease. *Cell Mol Immunol* **12**, 391–399 (2015).
101. Buhler, S. *et al.* Genetic T-cell receptor diversity at 1 year following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* **34**, (2020).
102. Li, Y. & Xu, L. Evaluation of TCR repertoire diversity in patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Stem cell investigation* **2**, (2015).
103. Eisenbarth, S. C. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nat Rev Immunol* **19**, 89–103 (2019).
104. Guilliams, M. *et al.* Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* **14**, 571–578 (2014).
105. Collin, M. & Bigley, V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* **154**, 3–20 (2018).
106. Shigematsu, H. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin. *Immunity* **21**, 43–53 (2004).
107. Karsunky, H., Merad, M., Cozzio, A., Weissman, I. L. & Manz, M. G. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J Exp Med* **198**, 305–313 (2003).

108. D'Amico, A. & Wu, L. The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J Exp Med* **198**, 293–303 (2003).
109. Patente, T. A. *et al.* Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology* **9**, (2019).
110. Wang, Y. *et al.* Dendritic cell biology and its role in tumor immunotherapy. *J Hematol Oncol* **13**, 107 (2020).
111. Kawasaki, T. & Kawai, T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology* **5**, (2014).
112. Brandum, E. P., Jørgensen, A. S., Rosenkilde, M. M. & Hjortø, G. M. Dendritic Cells and CCR7 Expression: An Important Factor for Autoimmune Diseases, Chronic Inflammation, and Cancer. *Int J Mol Sci* **22**, 8340 (2021).
113. Rock, K. L., Gamble, S. & Rothstein, L. Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science* **249**, 918–921 (1990).
114. Rock, K. L., Rothstein, L., Gamble, S. & Fleischacker, C. Characterization of antigen-presenting cells that present exogenous antigens in association with class I MHC molecules. *The Journal of Immunology* **150**, 438–446 (1993).
115. Grant, E. P. & Rock, K. L. MHC class I-restricted presentation of exogenous antigen by thymic antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Immunol* **148**, 13–18 (1992).
116. Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G. & Rock, K. L. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* **158**, 2723–2730 (1997).
117. Embgenbroich, M. & Burgdorf, S. Current Concepts of Antigen Cross-Presentation. *Front Immunol* **9**, 1643 (2018).
118. Sheng, J. *et al.* A Discrete Subset of Monocyte-Derived Cells among Typical Conventional Type 2 Dendritic Cells Can Efficiently Cross-Present. *Cell Rep* **21**, 1203–1214 (2017).
119. Ballesteros-Tato, A., León, B., Lund, F. E. & Randall, T. D. Temporal changes in dendritic cell subsets, cross-priming and costimulation via CD70 control CD8(+) T cell responses to influenza. *Nat Immunol* **11**, 216–224 (2010).
120. Backer, R., van Leeuwen, F., Kraal, G. & den Haan, J. M. M. CD8- dendritic cells preferentially cross-present *Saccharomyces cerevisiae* antigens. *Eur J Immunol* **38**, 370–380 (2008).

121. Mouriès, J. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood* **112**, 3713–3722 (2008).
122. Swiecki, M. & Colonna, M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* **15**, 471–485 (2015).
123. Musumeci, A., Lutz, K., Winheim, E. & Krug, A. B. What Makes a pDC: Recent Advances in Understanding Plasmacytoid DC Development and Heterogeneity. *Front Immunol* **10**, 1222 (2019).
124. Randolph, G. J., Inaba, K., Robbiani, D. F., Steinman, R. M. & Muller, W. A. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* **11**, 753–761 (1999).
125. León, B., López-Bravo, M. & Ardavin, C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity* **26**, 519–531 (2007).
126. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**, 1109–1118 (1994).
127. Dudek, A. M., Martin, S., Garg, A. D. & Agostinis, P. Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity. *Front Immunol* **4**, 438 (2013).
128. Osmond, D. G. The turnover of B-cell populations. *Immunol Today* **14**, 34–37 (1993).
129. Sandel, P. C. & Monroe, J. G. Negative Selection of Immature B Cells by Receptor Editing or Deletion Is Determined by Site of Antigen Encounter. *Immunity* **10**, 289–299 (1999).
130. Ghosh, D., Jiang, W., Mukhopadhyay, D. & Mellins, E. D. New insights into B cells as antigen presenting cells. *Curr Opin Immunol* **70**, 129–137 (2021).
131. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature* **401**, 921–923 (1999).
132. Shiina, T., Hosomichi, K., Inoko, H. & Kulski, J. K. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet* **54**, 15–39 (2009).
133. Yan, C. *et al.* HLA-A Gene Polymorphism Defined by High-Resolution Sequence-Based Typing in 161 Northern Chinese Han People. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **1**, 304–309 (2003).

134. Sette, A. & Sidney, J. Nine major HLA class I supertypes account for the vast preponderance of HLA-A and -B polymorphism. *Immunogenetics* **50**, 201–212 (1999).
135. Horton, R. *et al.* Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet* **5**, 889–899 (2004).
136. Choo, S. Y. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. *Yonsei Med J* **48**, 11–23 (2007).
137. Blum, J. S., Wearsch, P. A. & Cresswell, P. Pathways of Antigen Processing. *Annu Rev Immunol* **31**, 443–473 (2013).
138. Oancea, G. *et al.* Structural arrangement of the transmission interface in the antigen ABC transport complex TAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 5551–5556 (2009).
139. Dong, G., Wearsch, P. A., Peaper, D. R., Cresswell, P. & Reinisch, K. M. Insights into MHC class I peptide loading from the structure of the tapasin/ERp57 heterodimer. *Immunity* **30**, 21–32 (2009).
140. Peters, J. M., Franke, W. W. & Kleinschmidt, J. A. Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem* **269**, 7709–7718 (1994).
141. Maupin-Furlow, J. Proteasomes and protein conjugation across domains of life. *Nat Rev Microbiol* **10**, 100–111 (2011).
142. Alfonso, C. & Karlsson, L. Nonclassical MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* **18**, 113–142 (2000).
143. Yoon, T. *et al.* Mapping the HLA-DO/HLA-DM complex by FRET and mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 11276–11281 (2012).
144. Guce, A. I. *et al.* HLA-DO acts as a substrate mimic to inhibit HLA-DM by a competitive mechanism. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 90–98 (2013).
145. Mak, T. W. & Saunders, M. E. 11 - Antigen Processing and Presentation. in *The Immune Response* (eds. Mak, T. W. & Saunders, M. E.) 279–309 (Academic Press, 2006). doi:10.1016/B978-012088451-3.50013-2.
146. Glazier, K. S. *et al.* Germinal center B cells regulate their capability to present antigen by modulation of HLA-DO. *J Exp Med* **195**, 1063–1069 (2002).
147. Neefjes, J., Jongasma, M. L. M., Paul, P. & Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* **11**, 823–836 (2011).
148. Definition of tumor microenvironment - NCI Dictionary of Cancer Terms - NCI. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/tumor-microenvironment> (2011).

149. Anderson, N. M. & Simon, M. C. Tumor Microenvironment. *Curr Biol* **30**, R921–R925 (2020).
150. Talaat, I. M. & Kim, B. A brief glimpse of a tangled web in a small world: Tumor microenvironment. *Front Med (Lausanne)* **9**, 1002715 (2022).
151. Glabman, R. A., Choyke, P. L. & Sato, N. Cancer-Associated Fibroblasts: Tumorigenicity and Targeting for Cancer Therapy. *Cancers (Basel)* **14**, 3906 (2022).
152. Sirica, A. E. & Gores, G. J. Desmoplastic stroma and cholangiocarcinoma: clinical implications and therapeutic targeting. *Hepatology* **59**, 2397–2402 (2014).
153. Dai, J. *et al.* Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Sig Transduct Target Ther* **5**, 1–10 (2020).
154. Warner, K., Ghaedi, M., Chung, D. C., Jacquelot, N. & Ohashi, P. S. Innate lymphoid cells in early tumor development. *Front Immunol* **13**, 948358 (2022).
155. Dhodapkar, M. V. & Dhodapkar, K. M. Tissue-Resident Memory-Like T Cells in Tumor Immunity: Clinical Implications. *Semin Immunol* **49**, 101415 (2020).
156. Kim, A. *et al.* The prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes assessment with hematoxylin and eosin sections in resected primary lung adenocarcinoma. *PLoS ONE* **14**, (2019).
157. Mao, Y. *et al.* The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* **11**, (2016).
158. Mukherji, B. Immunology of melanoma. *Clinics in Dermatology* **31**, 156–165 (2013).
159. Ropponen, K. M., Eskelinen, M. J., Lipponen, P. K., Alhava, E. & Kosma, V. M. Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *Journal of Pathology* **182**, (1997).
160. Li, J., Wang, J., Chen, R., Bai, Y. & Lu, X. The prognostic value of tumor-infiltrating T lymphocytes in ovarian cancer. *Oncotarget* **8**, (2017).
161. Shimizu, S. *et al.* Tumor-infiltrating CD8+ T-cell density is an independent prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. *Cancer Medicine* **8**, (2019).
162. Glaire, M. A. *et al.* Tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes and colorectal cancer recurrence by tumour and nodal stage. *British Journal of Cancer* **121**, (2019).
163. Shah, W. *et al.* A reversed CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes and a high percentage of CD4+FOXP3+ regulatory T cells are significantly associated with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the cervix. *Cellular and Molecular Immunology* **8**, (2011).

164. Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* **12**, 298–306 (2012).
165. Gonzalez, H., Hagerling, C. & Werb, Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev* **32**, 1267–1284 (2018).
166. Nishimura, T. *et al.* Distinct Role of Antigen-Specific T Helper Type 1 (Th1) and Th2 Cells in Tumor Eradication in Vivo. *J Exp Med* **190**, 617–628 (1999).
167. Amicarella, F. *et al.* Dual role of tumour-infiltrating T helper 17 cells in human colorectal cancer. *Gut* **66**, 692–704 (2017).
168. Yuen, G. J., Demissie, E. & Pillai, S. B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship. *Trends Cancer* **2**, 747–757 (2016).
169. Wouters, M. C. A. & Nelson, B. H. Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating B Cells and Plasma Cells in Human Cancer. *Clin Cancer Res* **24**, 6125–6135 (2018).
170. Gardner, A., de Mingo Pulido, Á. & Ruffell, B. Dendritic Cells and Their Role in Immunotherapy. *Frontiers in Immunology* **11**, (2020).
171. Mellman, I. Dendritic Cells: Master Regulators of the Immune Response. *Cancer Immunology Research* **1**, 145–149 (2013).
172. Barnes, T. A. & Amir, E. HYPE or HOPE: the prognostic value of infiltrating immune cells in cancer. *Br J Cancer* **117**, 451–460 (2017).
173. Stanton, S. E., Adams, S. & Disis, M. L. Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. *JAMA Oncol* **2**, 1354–1360 (2016).
174. Fridman, W. H., Zitvogel, L., Sautès-Fridman, C. & Kroemer, G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol* **14**, 717–734 (2017).
175. Baxevasis, C. N., Fortis, S. P. & Perez, S. A. The balance between breast cancer and the immune system: Challenges for prognosis and clinical benefit from immunotherapies. *Seminars in Cancer Biology* **72**, 76–89 (2021).
176. Stanton, S. E. & Disis, M. L. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer* **4**, 59 (2016).
177. Kaewkangsan, V. *et al.* Crucial Contributions by T Lymphocytes (Effector, Regulatory, and Checkpoint Inhibitor) and Cytokines (TH1, TH2, and TH17) to a

Pathological Complete Response Induced by Neoadjuvant Chemotherapy in Women with Breast Cancer. *J Immunol Res* **2016**, 4757405 (2016).

178. Vihervuori, H. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes and CD8+ T cells predict survival of triple-negative breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **145**, (2019).

179. Al-Saleh, K. *et al.* Predictive and prognostic significance of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in patients with luminal B/HER 2 negative breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Oncology Letters* **14**, (2017).

180. Mahmoud, S. M. A. *et al.* Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* **29**, 1949–1955 (2011).

181. Zitvogel, L., Galluzzi, L., Kepp, O., Smyth, M. J. & Kroemer, G. Type I interferons in anticancer immunity. *Nat Rev Immunol* **15**, 405–414 (2015).

182. Huang, Y. *et al.* CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget* **6**, 17462–17478 (2015).

183. Yang, X. *et al.* Prognostic significance of CD4/CD8 ratio in patients with breast cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **10**, (2017).

184. Bohling, S. D. & Allison, K. H. Immunosuppressive regulatory T cells are associated with aggressive breast cancer phenotypes: a potential therapeutic target. *Mod Pathol* **21**, 1527–1532 (2008).

185. Ohara, M. *et al.* Possible involvement of regulatory T cells in tumor onset and progression in primary breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* **58**, 441–447 (2009).

186. Shou, J., Zhang, Z., Lai, Y., Chen, Z. & Huang, J. Worse outcome in breast cancer with higher tumor-infiltrating FOXP3+ Tregs : a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* **16**, 687 (2016).

187. Whiteside, T. L. Disarming suppressor cells to improve immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* **61**, 283–288 (2012).

188. West, N. R. *et al.* Tumour-infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. *Br J Cancer* **108**, 155–162 (2013).

189. Bates, G. J. *et al.* Quantification of Regulatory T Cells Enables the Identification of High-Risk Breast Cancer Patients and Those at Risk of Late Relapse. *Journal of Clinical Oncology* **24**, 5373–5380 (2006).

190. Miyashita, M. *et al.* Tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in triple-negative breast cancer: its correlation with pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* **148**, 525–534 (2014).

191. Asano, Y. *et al.* Tumour-infiltrating CD8 to FOXP3 lymphocyte ratio in predicting treatment responses to neoadjuvant chemotherapy of aggressive breast cancer. *Br J Surg* **103**, 845–854 (2016).
192. Nabholz, J. M. *et al.* Multicentric neoadjuvant phase II study of panitumumab combined with an anthracycline/taxane-based chemotherapy in operable triple-negative breast cancer: identification of biologically defined signatures predicting treatment impact. *Ann Oncol* **25**, 1570–1577 (2014).
193. Muranski, P. & Restifo, N. P. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* **121**, 2402–2414 (2013).
194. Karpishev, V. *et al.* The role of Th17 cells in the pathogenesis and treatment of breast cancer. *Cancer Cell Int* **22**, 108 (2022).
195. Garaud, S. *et al.* Tumor-infiltrating B cells signal functional humoral immune responses in breast cancer. *JCI Insight* **4**, e219641 (2019).
196. Ishigami, E. *et al.* Coexistence of regulatory B cells and regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocyte aggregates is a prognostic factor in patients with breast cancer. *Breast Cancer* **26**, 180–189 (2019).
197. Mahmoud, S. M. A. *et al.* The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat* **132**, 545–553 (2012).
198. Gu-Trantien, C. *et al.* CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *Journal of Clinical Investigation* **123**, 2873–2892 (2013).
199. Bense, R. D. *et al.* Relevance of Tumor-Infiltrating Immune Cell Composition and Functionality for Disease Outcome in Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* **109**, (2017).
200. Tay, R. E., Richardson, E. K. & Toh, H. C. Revisiting the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy—new insights into old paradigms. *Cancer Gene Ther* **28**, 5–17 (2021).
201. Ilyas, S. & Yang, J. C. Landscape of Tumor Antigens in T Cell Immunotherapy. *J Immunol* **195**, 5117–5122 (2015).
202. Tran, E., Robbins, P. F. & Rosenberg, S. A. ‘Final common pathway’ of human cancer immunotherapy: targeting random somatic mutations. *Nat Immunol* **18**, 255–262 (2017).
203. Aung, P. P. *et al.* Expression of New York esophageal squamous cell carcinoma-1 in primary and metastatic melanoma. *Hum Pathol* **45**, 259–267 (2014).
204. Lai, J.-P. *et al.* NY-ESO-1 expression in synovial sarcoma and other mesenchymal tumors: significance for NY-ESO-1-based targeted therapy and differential diagnosis. *Mod Pathol* **25**, 854–858 (2012).

Bibliografía

205. Kerkar, S. P. *et al.* MAGE-A is More Highly Expressed Than NY-ESO-1 in a Systematic Immunohistochemical Analysis of 3668 Cases. *J Immunother* **39**, 181–187 (2016).
206. Robbins, P. F. *et al.* A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response. *Clin Cancer Res* **21**, 1019–1027 (2015).
207. Thomas, R. *et al.* NY-ESO-1 Based Immunotherapy of Cancer: Current Perspectives. *Frontiers in Immunology* **9**, (2018).
208. van der Bruggen, P. *et al.* A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**, 1643–1647 (1991).
209. Oh, C. *et al.* Epigenetic Upregulation of MAGE-A Isoforms Promotes Breast Cancer Cell Aggressiveness. *Cancers* **13**, 3176 (2021).
210. Sharma, P. *et al.* Frequency of NY-ESO-1 and LAGE-1 expression in bladder cancer and evidence of a new NY-ESO-1 T-cell epitope in a patient with bladder cancer. *Cancer Immun* **3**, 19 (2003).
211. Kurashige, T. *et al.* NY-ESO-1 Expression and Immunogenicity Associated with Transitional Cell Carcinoma: Correlation with Tumor Grade¹. *Cancer Research* **61**, 4671–4674 (2001).
212. Bolli, M. *et al.* NY-ESO-1/LAGE-1 coexpression with MAGE-A cancer/testis antigens: a tissue microarray study. *Int J Cancer* **115**, 960–966 (2005).
213. Akcakanat, A. *et al.* NY-ESO-1 expression and its serum immunoreactivity in esophageal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **54**, 95–100 (2004).
214. Prasad, M. L. *et al.* Expression and significance of cancer testis antigens in primary mucosal melanoma of the head and neck. *Head Neck* **26**, 1053–1057 (2004).
215. Jungbluth, A. A. *et al.* Immunohistochemical analysis of NY-ESO-1 antigen expression in normal and malignant human tissues. *Int J Cancer* **92**, 856–860 (2001).
216. Odunsi, K. *et al.* NY-ESO-1 and LAGE-1 cancer-testis antigens are potential targets for immunotherapy in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* **63**, 6076–6083 (2003).
217. Fosså, A. *et al.* NY-ESO-1 protein expression and humoral immune responses in prostate cancer. *Prostate* **59**, 440–447 (2004).
218. Bergeron, A. *et al.* High frequency of MAGE-A4 and MAGE-A9 expression in high-risk bladder cancer. *Int J Cancer* **125**, 1365–1371 (2009).
219. Sang, M., Lian, Y., Zhou, X. & Shan, B. MAGE-A family: attractive targets for cancer immunotherapy. *Vaccine* **29**, 8496–8500 (2011).

220. Weon, J. L. & Potts, P. R. The MAGE protein family and cancer. *Curr Opin Cell Biol* **37**, 1–8 (2015).
221. Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* **179**, 1005–1009 (1994).
222. Kawakami, Y. *et al.* Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* **180**, 347–352 (1994).
223. Disis, M. L. *et al.* Concurrent Trastuzumab and HER2/neu-Specific Vaccination in Patients With Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol* **27**, 4685–4692 (2009).
224. Disis, M. L., Knutson, K. L., Schiffman, K., Rinn, K. & McNeel, D. G. Pre-existent immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with HER-2/neu overexpressing breast and ovarian cancer. *Breast Cancer Res Treat* **62**, 245–252 (2000).
225. Zamora, A. E., Crawford, J. C. & Thomas, P. G. Hitting the target: how T cells detect and eliminate tumors. *J Immunol* **200**, 392–399 (2018).
226. Hoffmann, M. M. & Slansky, J. E. T-cell receptor affinity in the age of cancer immunotherapy. *Mol Carcinog* **59**, 862–870 (2020).
227. Bareke, H. *et al.* Autoimmune Responses in Oncology: Causes and Significance. *Int J Mol Sci* **22**, 8030 (2021).
228. Prehn, R. T. & Main, J. M. Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst* **18**, 769–778 (1957).
229. Schrama, D., Ritter, C. & Becker, J. C. T cell receptor repertoire usage in cancer as a surrogate marker for immune responses. *Semin Immunopathol* **39**, 255–268 (2017).
230. Unanue, E. R., Turk, V. & Neefjes, J. Variations in MHC Class II Antigen Processing and Presentation in Health and Disease. *Annu Rev Immunol* **34**, 265–297 (2016).
231. O'Donnell, J. S., Teng, M. W. L. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* **16**, 151–167 (2019).
232. Vesely, M. D. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: Antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1284**, (2013).
233. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**, 1565–1570 (2011).

234. Cornel, A. M., Mimpfen, I. L. & Nierkens, S. MHC Class I Downregulation in Cancer: Underlying Mechanisms and Potential Targets for Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)* **12**, 1760 (2020).
235. Zhai, L. *et al.* Immunosuppressive IDO in Cancer: Mechanisms of Action, Animal Models, and Targeting Strategies. *Front Immunol* **11**, 1185 (2020).
236. Guo, Q., Huang, F., Goncalves, C., Del Rincón, S. V. & Miller, W. H. Translation of cancer immunotherapy from the bench to the bedside. *Adv Cancer Res* **143**, 1–62 (2019).
237. van Nieuwenhuijze, A. & Liston, A. Chapter Four - The Molecular Control of Regulatory T Cell Induction. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (ed. Liston, A.) vol. 136 69–97 (Academic Press, 2015).
238. Hu, W., Wang, G., Wang, Y., Riese, M. J. & You, M. Uncoupling Therapeutic Efficacy from Immune-Related Adverse Events in Immune Checkpoint Blockade. *iScience* **23**, 101580 (2020).
239. Robins, H. S. *et al.* Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells. *Blood* **114**, 4099–4107 (2009).
240. Charles, J. *et al.* T-cell receptor diversity as a prognostic biomarker in melanoma patients. *Pigment Cell Melanoma Res* **33**, 612–624 (2020).
241. Manuel, M. *et al.* Lymphopenia combined with low TCR diversity (divpenia) predicts poor overall survival in metastatic breast cancer patients. *Oncimmunology* **1**, 432–440 (2012).
242. Cui, J.-H. *et al.* TCR Repertoire as a Novel Indicator for Immune Monitoring and Prognosis Assessment of Patients With Cervical Cancer. *Front Immunol* **9**, 2729 (2018).
243. Jin, Y.-B. *et al.* TCR repertoire profiling of tumors, adjacent normal tissues, and peripheral blood predicts survival in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* **67**, 1719–1730 (2018).
244. Bai, X. *et al.* Characteristics of Tumor Infiltrating Lymphocyte and Circulating Lymphocyte Repertoires in Pancreatic Cancer by the Sequencing of T Cell Receptors. *Sci Rep* **5**, 13664 (2015).
245. Emerson, R. O. *et al.* High-throughput sequencing of T cell receptors reveals a homogeneous repertoire of tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *J Pathol* **231**, 433–440 (2013).
246. Cui, C. *et al.* T cell receptor β -chain repertoire analysis of tumor-infiltrating lymphocytes in pancreatic cancer. *Cancer Sci* **110**, 61–71 (2019).

247. Haanen, J. B. a. G. *et al.* Melanoma-specific tumor-infiltrating lymphocytes but not circulating melanoma-specific T cells may predict survival in resected advanced-stage melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* **55**, 451–458 (2006).
248. Keane, C. *et al.* The T-cell Receptor Repertoire Influences the Tumor Microenvironment and Is Associated with Survival in Aggressive B-cell Lymphoma. *Clin Cancer Res* **23**, 1820–1828 (2017).
249. Kuang, M. *et al.* A novel signature for stratifying the molecular heterogeneity of the tissue-infiltrating T-cell receptor repertoire reflects gastric cancer prognosis. *Sci Rep* **7**, 7762 (2017).
250. Lin, K.-R. *et al.* T cell receptor repertoire profiling predicts the prognosis of HBV-associated hepatocellular carcinoma. *Cancer Med* **7**, 3755–3762 (2018).
251. Buder-Bakhaya, K. & Hassel, J. C. Biomarkers for Clinical Benefit of Immune Checkpoint Inhibitor Treatment—A Review From the Melanoma Perspective and Beyond. *Front Immunol* **9**, 1474 (2018).
252. Ramos-Casals, M. *et al.* Immune-related adverse events of checkpoint inhibitors. *Nat Rev Dis Primers* **6**, 38 (2020).
253. Zhou, X. *et al.* Are immune-related adverse events associated with the efficacy of immune checkpoint inhibitors in patients with cancer? A systematic review and meta-analysis. *BMC Med* **18**, 87 (2020).
254. Liu, Y.-H. *et al.* Diagnosis and Management of Immune Related Adverse Events (irAEs) in Cancer Immunotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **120**, 109437 (2019).
255. Maleki Vareki, S. High and low mutational burden tumors versus immunologically hot and cold tumors and response to immune checkpoint inhibitors. *J. immunotherapy cancer* **6**, 157, s40425-018-0479-7 (2018).
256. Bi, F., Chen, Y. & Yang, Q. Significance of tumor mutation burden combined with immune infiltrates in the progression and prognosis of ovarian cancer. *Cancer Cell Int* **20**, 373 (2020).
257. Jiang, F. *et al.* Multi-omics analysis of tumor mutation burden combined with immune infiltrates in melanoma. *Clin Chim Acta* **511**, 306–318 (2020).
258. Jiang, T. *et al.* Genomic landscape and its correlations with tumor mutational burden, PD-L1 expression, and immune cells infiltration in Chinese lung squamous cell carcinoma. *J Hematol Oncol* **12**, 75 (2019).
259. Karn, T. *et al.* Tumor mutational burden and immune infiltration as independent predictors of response to neoadjuvant immune checkpoint inhibition in early TNBC in GeparNuevo. *Ann Oncol* **31**, 1216–1222 (2020).

Bibliografía

260. Marderstein, A. R. *et al.* Demographic and genetic factors influence the abundance of infiltrating immune cells in human tissues. *Nat Commun* **11**, 2213 (2020).
261. Chen, J. J. W. *et al.* Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression. *J Clin Oncol* **23**, 953–964 (2005).
262. Poh, A. R. & Ernst, M. Targeting Macrophages in Cancer: From Bench to Bedside. *Frontiers in Oncology* **8**, 49 (2018).
263. Savas, P. *et al.* Single-cell profiling of breast cancer T cells reveals a tissue-resident memory subset associated with improved prognosis. *Nat Med* **24**, 986–993 (2018).
264. Peng, T. *et al.* Distinct populations of antigen-specific tissue-resident CD8+ T cells in human cervix mucosa. *JCI Insight* **6**, 149950 (2021).
265. Pasetto, A. *et al.* Tumor- and Neoantigen-Reactive T-cell Receptors Can Be Identified Based on Their Frequency in Fresh Tumor. *Cancer Immunology Research* **4**, 734–743 (2016).
266. Gros, A. *et al.* PD-1 identifies the patient-specific CD8+ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest* **124**, 2246–2259 (2014).
267. Tumeh, P. C. *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* **515**, 568–571 (2014).
268. Roh, W. *et al.* Integrated molecular analysis of tumor biopsies on sequential CTLA-4 and PD-1 blockade reveals markers of response and resistance. *Sci Transl Med* **9**, eaah3560 (2017).
269. Kim, H., Jen, J., Vogelstein, B. & Hamilton, S. R. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* **145**, 148–156 (1994).
270. Vilar, E. & Gruber, S. B. Microsatellite instability in colorectal cancer—the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol* **7**, 153–162 (2010).
271. Gubin, M. M. *et al.* Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* **515**, 577–581 (2014).
272. Overman, M. J. *et al.* Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* **18**, 1182–1191 (2017).
273. Sahin, I. H. *et al.* Immune checkpoint inhibitors for the treatment of MSI-H/MMR-D colorectal cancer and a perspective on resistance mechanisms. *Br J Cancer* **121**, 809–818 (2019).

274. Dolcetti, R. *et al.* High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am J Pathol* **154**, 1805–1813 (1999).
275. Smyrk, T. C., Watson, P., Kaul, K. & Lynch, H. T. Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer* **91**, 2417–2422 (2001).
276. Llosa, N. J. *et al.* The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov* **5**, 43–51 (2015).
277. Nosho, K. *et al.* Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol* **222**, 350–366 (2010).
278. Le, D. T. *et al.* Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* **357**, 409–413 (2017).
279. Sanz-Pamplona, R. *et al.* Lymphocytic infiltration in stage II microsatellite stable colorectal tumors: A retrospective prognosis biomarker analysis. *PLoS Med* **17**, e1003292 (2020).
280. Bolotin, D. A. *et al.* MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat Methods* **12**, 380–381 (2015).
281. Shugay, M. *et al.* VDJtools: Unifying Post-analysis of T Cell Receptor Repertoires. *PLoS Computational Biology* **11**, e1004503 (2015).
282. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. (2019).
283. Nazarov, V. *et al.* immunarch: Bioinformatics Analysis of T-Cell and B-Cell Immune Repertoires. (2022).
284. Introduction — vdjtools SNAPSHOT documentation. <https://vdjtools-doc.readthedocs.io/en/master/intro.html>.
285. Bioinformatics Analysis of T-Cell and B-Cell Immune Repertoires. <https://immunarch.com/>.
286. Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K. & RStudio. dplyr: A Grammar of Data Manipulation. (2020).
287. Neuwirth, E. RColorBrewer: ColorBrewer Palettes. (2014).
288. Conway, J. R., Lex, A. & Gehlenborg, N. UpSetR: an R package for the visualization of intersecting sets and their properties. *Bioinformatics* **33**, 2938–2940 (2017).

289. Tickotsky, N., Sagiv, T., Prilusky, J., Shifrut, E. & Friedman, N. McPAS-TCR: a manually curated catalogue of pathology-associated T cell receptor sequences. *Bioinformatics* **33**, 2924–2929 (2017).
290. Glanville, J. *et al.* Identifying specificity groups in the T cell receptor repertoire. *Nature* **547**, 94–98 (2017).
291. Huang, H., Wang, C., Rubelt, F., Scriba, T. J. & Davis, M. M. Analyzing the Mycobacterium tuberculosis immune response by T-cell receptor clustering with GLIPH2 and genome-wide antigen screening. *Nat Biotechnol* **38**, 1194–1202 (2020).
292. Consortium, T. U. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res* **47**, D506–D515 (2019).
293. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**, 44–57 (2009).
294. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* **37**, 1–13 (2009).
295. Andreatta, M., Alvarez, B. & Nielsen, M. GibbsCluster: unsupervised clustering and alignment of peptide sequences. *Nucleic Acids Res* **45**, W458–W463 (2017).
296. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data | Nucleic Acids Research | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/nar/article/48/W1/W449/5837056>.
297. Demšar, J. *et al.* Orange: Data Mining Toolbox in Python. *Journal of Machine Learning Research* **14**, 2349–2353 (2013).
298. Caron, E. *et al.* An open-source computational and data resource to analyze digital maps of immunopeptidomes. *eLife* **4**, e07661 (2015).
299. Bassani-Sternberg, M., Pletscher-Frankild, S., Jensen, L. J. & Mann, M. Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation. *Mol Cell Proteomics* **14**, 658–673 (2015).
300. Granados, D. P. *et al.* MHC I-associated peptides preferentially derive from transcripts bearing miRNA response elements. *Blood* **119**, e181–e191 (2012).
301. Lanoix, J. *et al.* Comparison of the MHC I Immunopeptidome Repertoire of B-Cell Lymphoblasts Using Two Isolation Methods. *Proteomics* **18**, e1700251 (2018).

302. Liepe, J. *et al.* A large fraction of HLA class I ligands are proteasome-generated spliced peptides. *Science* **354**, 354–358 (2016).
303. Schellens, I. M. M. *et al.* Comprehensive Analysis of the Naturally Processed Peptide Repertoire: Differences between HLA-A and B in the Immunopeptidome. *PLOS ONE* **10**, e0136417 (2015).
304. Lippolis, J. D. *et al.* Analysis of MHC Class II Antigen Processing by Quantitation of Peptides that Constitute Nested Sets. *J Immunol* **169**, 5089–5097 (2002).
305. Dengjel, J. *et al.* Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 7922–7927 (2005).
306. Verreck, F. A. W. *et al.* Natural peptides isolated from Gly6/Va186-containing variants of HLA-DR1, -DR11, -DR13, and -DR52. *Immunogenetics* **43**, 392–397 (1996).
307. Futaki, G., Kobayashi, H., Sato, K., Taneichi, M. & Katagiri, M. Naturally processed HLA-DR9/DR53 (DRB1*0901/DRB4*0101)-bound peptides. *Immunogenetics* **42**, 299–301 (1995).
308. Davenport, M. P. *et al.* Naturally processed peptides from two disease-resistance-associated HLA-DR13 alleles show related sequence motifs and the effects of the dimorphism at position 86 of the HLA-DR13 chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 6567–6571 (1995).
309. Falk, K., Rötzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. & Rammensee, H.-G. Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules. *Immunogenetics* **39**, 230–242 (1994).
310. Chicz, R. M. *et al.* Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* **358**, 764–768 (1992).
311. Chicz, R. M. *et al.* Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J Exp Med* **178**, 27–47 (1993).
312. Muixí, L. *et al.* The peptide-binding motif of HLA-DR8 shares important structural features with other type 1 diabetes-associated alleles. *Genes Immun* **12**, 504–512 (2011).
313. Alvarez, I. *et al.* The rheumatoid arthritis-associated allele HLA-DR10 (DRB1*1001) shares part of its repertoire with HLA-DR1 (DRB1*0101) and HLA-DR4 (DRB*0401). *Arthritis Rheum* **58**, 1630–1639 (2008).
314. The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/>.

315. Pontén, F., Jirström, K. & Uhlen, M. The Human Protein Atlas - a tool for pathology. *J. Pathol.* **216**, 387–393 (2008).
316. Uhlen, M. *et al.* A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science* **357**, eaan2507 (2017).
317. Brummelman, J., Pilipow, K. & Lugli, E. Chapter Two - The Single-Cell Phenotypic Identity of Human CD8+ and CD4+ T Cells. in *International Review of Cell and Molecular Biology* (eds. Galluzzi, L. & Rudqvist, N.-P.) vol. 341 63–124 (Academic Press, 2018).
318. Poschke, I. C. *et al.* The Outcome of *Ex Vivo* TIL Expansion Is Highly Influenced by Spatial Heterogeneity of the Tumor T-Cell Repertoire and Differences in Intrinsic *In Vitro* Growth Capacity between T-Cell Clones. *Clin Cancer Res* **26**, 4289–4301 (2020).
319. Mani, N. L. *et al.* Quantitative assessment of the spatial heterogeneity of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Breast Cancer Research* **18**, 78 (2016).
320. Kilmartin, D. *et al.* Intra-Tumour Heterogeneity Is One of the Main Sources of Inter-Observer Variation in Scoring Stromal Tumour Infiltrating Lymphocytes in Triple Negative Breast Cancer. *Cancers* **13**, 4410 (2021).
321. Althobiti, M. *et al.* Heterogeneity of tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer and its prognostic significance. *Histopathology* **73**, 887–896 (2018).
322. Kawaguchi, K. *et al.* Alteration of specific cytokine expression patterns in patients with breast cancer. *Sci Rep* **9**, 2924 (2019).
323. He, D. *et al.* IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* **184**, 2281–2288 (2010).
324. Coffelt, S. B. *et al.* IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* **522**, 345–348 (2015).
325. Zhang, J.-P. *et al.* Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol* **50**, 980–989 (2009).
326. Zhu, X. *et al.* IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res* **10**, R95 (2008).
327. Chen, X. *et al.* Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. *Lung Cancer* **69**, 348–354 (2010).
328. Pan, B. *et al.* Interleukin-17 promotes angiogenesis by stimulating VEGF production of cancer cells via the STAT3/GIV signaling pathway in non-small-cell lung cancer. *Sci Rep* **5**, 16053 (2015).

329. Lyon, D. E., McCain, N. L., Walter, J. & Schubert, C. Cytokine comparisons between women with breast cancer and women with a negative breast biopsy. *Nurs Res* **57**, 51–58 (2008).
330. Benevides, L. *et al.* IL17 Promotes Mammary Tumor Progression by Changing the Behavior of Tumor Cells and Eliciting Tumorigenic Neutrophils Recruitment. *Cancer Res* **75**, 3788–3799 (2015).
331. Chen, J. *et al.* IL-17 inhibits CXCL9/10-mediated recruitment of CD8+ cytotoxic T cells and regulatory T cells to colorectal tumors. *J Immunother Cancer* **7**, 324 (2019).
332. Hou, X. *et al.* Shorter TCR β -chains are highly enriched during thymic selection and antigen driven selection. *Frontiers in Immunology* **10**, (2019).
333. Li, H. M. *et al.* TCR repertoire of CD4+ and CD8+ T cells is distinct in richness, distribution, and CDR3 amino acid composition. *Journal of Leukocyte Biology* **99**, (2016).
334. Gordin, M. *et al.* Breast cancer is marked by specific, Public T-cell receptor CDR3 regions shared by mice and humans. *PLoS Comput Biol* **17**, e1008486 (2021).
335. Hou, X. *et al.* Shorter TCR β -chains are highly enriched during thymic selection and antigen driven selection. *Frontiers in Immunology* **10**, 299 (2019).
336. Li, H. M. *et al.* TCR repertoire of CD4+ and CD8+ T cells is distinct in richness, distribution, and CDR3 amino acid composition. *Journal of Leukocyte Biology* **99**, 505–513 (2016).
337. Heikkilä, N. *et al.* Human thymic T cell repertoire is imprinted with strong convergence to shared sequences. *Molecular Immunology* **127**, 112–123 (2020).
338. Looney, T. J. *et al.* TCR Convergence in Individuals Treated With Immune Checkpoint Inhibition for Cancer. *Frontiers in Immunology* **10**, 2985 (2020).
339. Qi, Q. *et al.* Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 13139–13144 (2014).
340. Qi, Q. *et al.* Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, (2014).
341. Poschke, I. C. *et al.* The Outcome of Ex Vivo TIL Expansion Is Highly Influenced by Spatial Heterogeneity of the Tumor T-Cell Repertoire and Differences in Intrinsic in Vitro Growth Capacity between T-Cell Clones. *Clinical Cancer Research* **26**, 4289–4301 (2020).

342. La Gruta, N. L., Gras, S., Daley, S. R., Thomas, P. G. & Rossjohn, J. Understanding the drivers of MHC restriction of T cell receptors. *Nature Reviews Immunology* **18**, 467–478 (2018).
343. Nishio, J., Suzuki, M., Nanki, T., Miyasaka, N. & Kohsaka, H. Development of TCRB CDR3 length repertoire of human T lymphocytes. *International Immunology* **16**, (2004).
344. Singh, N. K. *et al.* Emerging Concepts in TCR Specificity: Rationalizing and (Maybe) Predicting Outcomes. *The Journal of Immunology* **199**, (2017).
345. Yu, K., Shi, J., Lu, D. & Yang, Q. Comparative analysis of CDR3 regions in paired human $\alpha\beta$ CD8 T cells. *FEBS Open Bio* **9**, 1450–1459 (2019).
346. Baker, B. M., Scott, D. R., Blevins, S. J. & Hawse, W. F. Structural and dynamic control of T-cell receptor specificity, cross-reactivity, and binding mechanism. *Immunological Reviews* **250**, (2012).
347. Wucherpfennig, K. W. *et al.* Polyspecificity of T cell and B cell Receptor Recognition. *Semin Immunol* **19**, 216–224 (2007).
348. Wang, T. *et al.* The Different T-cell Receptor Repertoires in Breast Cancer Tumors, Draining Lymph Nodes, and Adjacent Tissues. *Cancer Immunol Res* **5**, 148–156 (2017).
349. Beausang, J. F. *et al.* T cell receptor sequencing of early-stage breast cancer tumors identifies altered clonal structure of the T cell repertoire. *PNAS* **114**, E10409–E10417 (2017).
350. Zhang, C. *et al.* TCR repertoire intratumor heterogeneity of CD4+ and CD8+ T cells in centers and margins of localized lung adenocarcinomas. *Int J Cancer* **144**, 818–827 (2019).
351. Egorov, E. S. *et al.* The changing landscape of naive T cell receptor repertoire with human aging. *Frontiers in Immunology* **9**, (2018).
352. Zheng, M. *et al.* TCR repertoire and CDR3 motif analyses depict the role of $\alpha\beta$ T cells in Ankylosing spondylitis. *EBioMedicine* **47**, 414–426 (2019).
353. Johnson, D. B. *et al.* A case report of clonal EBV-like memory CD4+ T cell activation in fatal checkpoint inhibitor-induced encephalitis. *Nature Medicine* **25**, 1243–1250 (2019).
354. Ribeiro, R., Carvalho, M. J., Goncalves, J. & Moreira, J. N. Immunotherapy in triple-negative breast cancer: Insights into tumor immune landscape and therapeutic opportunities. *Frontiers in Molecular Biosciences* **9**, (2022).

355. García-Tejido, P., Cabal, M. L., Fernández, I. P. & Pérez, Y. F. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple Negative Breast Cancer: The Future of Immune Targeting. *Clin Med Insights Oncol* **10**, 31–39 (2016).
356. Heimes, A.-S. & Schmidt, M. Immuno-oncology in triple-negative breast cancer. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment* **7**, 9 (2021).
357. Morgan, R. A. *et al.* Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J Immunother* **36**, 133–151 (2013).
358. Audehm, S. *et al.* Key Features Relevant to Select Antigens and TCR From the MHC-Mismatched Repertoire to Treat Cancer. *Front Immunol* **10**, 1485 (2019).
359. Wakeland, E. K. *et al.* Ancestral polymorphisms of MHC class II genes: divergent allele advantage. *Immunol Res* **9**, 115–122 (1990).
360. Parham, P. & Ohta, T. Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules. *Science* **272**, 67–74 (1996).
361. Abelin, J. G. *et al.* Mass Spectrometry Profiling of HLA-Associated Peptidomes in Mono-allelic Cells Enables More Accurate Epitope Prediction. *Immunity* **46**, 315–326 (2017).
362. Bassani-Sternberg, M., Pletscher-Frankild, S., Jensen, L. J. & Mann, M. Mass Spectrometry of Human Leukocyte Antigen Class I Peptidomes Reveals Strong Effects of Protein Abundance and Turnover on Antigen Presentation*[S]. *Molecular & Cellular Proteomics* **14**, 658–673 (2015).
363. Collado, J. A. *et al.* Composition of the HLA-DR-associated human thymus peptidome. *European Journal of Immunology* **43**, 2273–2282 (2013).
364. Mommen, G. P. M. *et al.* Sampling From the Proteome to the Human Leukocyte Antigen-DR (HLA-DR) Ligandome Proceeds Via High Specificity. *Mol Cell Proteomics* **15**, 1412–1423 (2016).
365. Karnaukhov, V. *et al.* HLA binding of self-peptides is biased towards proteins with specific molecular functions. 2021.02.16.431395 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2021.02.16.431395> (2021).
366. Ciudad, M. T. *et al.* Analysis of the HLA-DR peptidome from human dendritic cells reveals high affinity repertoires and nonconventional pathways of peptide generation. *Journal of Leukocyte Biology* **101**, 15–27 (2017).
367. Kampstra, A. S. B. *et al.* Ligandomes obtained from different HLA-class II-molecules are homologous for N- and C-terminal residues outside the peptide-binding cleft. *Immunogenetics* **71**, 519–530 (2019).

368. Caserta, S., Kleczkowska, J., Mondino, A. & Zamoyska, R. Reduced functional avidity promotes central and effector memory CD4 T cell responses to tumor-associated antigens. *J Immunol* **185**, 6545–6554 (2010).
369. Doherty, P. C. & Zinkernagel, R. M. Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature* **256**, 50–52 (1975).
370. Pierini, F. & Lenz, T. L. Divergent Allele Advantage at Human MHC Genes: Signatures of Past and Ongoing Selection. *Mol Biol Evol* **35**, 2145–2158 (2018).
371. Kuroda, H. *et al.* Tumor-infiltrating B cells and T cells correlate with postoperative prognosis in triple-negative carcinoma of the breast. *BMC Cancer* **21**, 286 (2021).
372. Shimabukuro-Vornhagen, A. *et al.* Characterization of tumor-associated B-cell subsets in patients with colorectal cancer. *Oncotarget* **5**, 4651–4664 (2014).
373. Nielsen, J. S. *et al.* CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27- memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **18**, 3281–3292 (2012).
374. Garnelo, M. *et al.* Interaction between tumour-infiltrating B cells and T cells controls the progression of hepatocellular carcinoma. *Gut* **66**, 342–351 (2017).
375. Petitprez, F. *et al.* B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. *Nature* **577**, 556–560 (2020).
376. Bruno, T. C. *et al.* Antigen-Presenting Intratumoral B Cells Affect CD4+ TIL Phenotypes in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Cancer Immunol Res* **5**, 898–907 (2017).
377. Epstein, M. A., Achong, B. G. & Barr, Y. M. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* **1**, 702–703 (1964).
378. Bondarenko, G. *et al.* Patient-Derived Tumor Xenografts Are Susceptible to Formation of Human Lymphocytic Tumors. *Neoplasia* **17**, 735–741 (2015).
379. Pannone, G. *et al.* The role of EBV in the pathogenesis of Burkitt's Lymphoma: an Italian hospital based survey. *Infect. Agents Cancer* **9**, 34 (2014).
380. Küppers, R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 15–27 (2009).
381. Massini, G., Siemer, D. & Hohaus, S. EBV in Hodgkin Lymphoma. *Mediterr J Hematol Infect Dis* **1**, e2009013 (2009).
382. Carbone, A., Gloghini, A. & Dotti, G. EBV-Associated Lymphoproliferative Disorders: Classification and Treatment. *The Oncologist* **13**, 577–585 (2008).

383. Green, M. & Michaels, M. G. Epstein–Barr Virus Infection and Posttransplant Lymphoproliferative Disorder. *American Journal of Transplantation* **13**, 41–54 (2013).
384. Stern, J., Miller, G., Li, X. & Saxena, D. Virome and bacteriome: two sides of the same coin. *Curr Opin Virol* **37**, 37–43 (2019).
385. Shannon-Lowe, C. & Rickinson, A. The Global Landscape of EBV-Associated Tumors. *Front Oncol* **9**, 713 (2019).
386. Hicklin, D. J., Marincola, F. M. & Ferrone, S. HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol Med Today* **5**, 178–186 (1999).
387. Tangye, S. G. & Latour, S. Primary immunodeficiencies reveal the molecular requirements for effective host defense against EBV infection. *Blood* **135**, 644–655 (2020).
388. Shannon-Lowe, C., Rickinson, A. B. & Bell, A. I. Epstein–Barr virus-associated lymphomas. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **372**, 20160271 (2017).
389. John, T. *et al.* Characterization of lymphomas developing in immunodeficient mice implanted with primary human non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* **7**, 1101–1108 (2012).
390. Dieter, S. M. *et al.* Patient-derived xenografts of gastrointestinal cancers are susceptible to rapid and delayed B-lymphoproliferation. *Int J Cancer* **140**, 1356–1363 (2017).
391. Long, H. M., Meckiff, B. J. & Taylor, G. S. The T-cell Response to Epstein-Barr Virus—New Tricks From an Old Dog. *Front. Immunol.* **10**, 2193 (2019).
392. Johnson, D. B. *et al.* Fulminant Myocarditis with Combination Immune Checkpoint Blockade. *New England Journal of Medicine* **375**, 1749–1755 (2016).
393. Aran, A. *et al.* Epstein-Barr Virus+ B Cells in Breast Cancer Immune Response: A Case Report. *Front Immunol* **12**, 761798 (2021).
394. Wu, A. A., Drake, V., Huang, H.-S., Chiu, S. & Zheng, L. Reprogramming the tumor microenvironment: tumor-induced immunosuppressive factors paralyze T cells. *Oncimmunology* **4**, e1016700 (2015).
395. Seidel, J. A., Otsuka, A. & Kabashima, K. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front Oncol* **8**, 86 (2018).

396. Morandi, E., Jagessar, S. A., Hart, B. A. & Gran, B. EBV Infection Empowers Human B Cells for Autoimmunity: Role of Autophagy and Relevance to Multiple Sclerosis. *The Journal of Immunology* **199**, 435–448 (2017).
397. Abdallah, M. O. E. *et al.* EBV Associated Breast Cancer Whole Methyloome Analysis Reveals Viral and Developmental Enriched Pathways. *Front. Oncol.* **8**, 316 (2018).
398. Paradowska, E., Jabłońska, A., Studzińska, M., Wilczyński, M. & Wilczyński, J. R. Detection and genotyping of CMV and HPV in tumors and fallopian tubes from epithelial ovarian cancer patients. *Scientific Reports* **9**, 1–10 (2019).
399. Du, G., Zhang, W., Zhang, Z., Zeng, M. & Wang, Y. HTLV-1-associated genes as potential biomarkers for endometrial cancer. *Oncol Lett* **18**, 699–705 (2019).
400. Smatti, M. K. *et al.* Epstein–Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. *Front Oncol* **8**, 211 (2018).
401. Strowig, T. *et al.* Priming of protective T cell responses against virus-induced tumors in mice with human immune system components. *J. Exp. Med.* **206**, 1423–1434 (2009).
402. Fujiwara, S. & Nakamura, H. Animal Models for Gammaherpesvirus Infections: Recent Development in the Analysis of Virus-Induced Pathogenesis. *Pathogens* **9**, 116 (2020).
403. Krüger, S., Schroers, R., Rooney, C. M., Gahn, B. & Chen, S.-Y. Identification of a naturally processed HLA-DR-restricted T-helper epitope in Epstein-Barr virus nuclear antigen type 1. *J. Immunother.* **26**, 212–221 (2003).
404. Valenti, M. T. *et al.* The effect of bisphosphonates on gene expression: GAPDH as a housekeeping or a new target gene? *BMC Cancer* **6**, 49 (2006).
405. Révillion, F., Pawlowski, V., Hornez, L. & Peyrat, J. P. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human breast cancer. *Eur J Cancer* **36**, 1038–1042 (2000).
406. Sharonov, G. V., Serebrovskaya, E. O., Yuzhakova, D. V., Britanova, O. V. & Chudakov, D. M. B cells, plasma cells and antibody repertoires in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology* **20**, 294–307 (2020).
407. Neparidze, N. & Lacy, J. Malignancies associated with epstein-barr virus: pathobiology, clinical features, and evolving treatments. *Clin Adv Hematol Oncol* **12**, 358–371 (2014).

408. Mrozek-Gorska, P. *et al.* Epstein–Barr virus reprograms human B lymphocytes immediately in the prelatent phase of infection. *PNAS* **116**, 16046–16055 (2019).
409. Sewell, A. K. Why must T cells be cross-reactive? *Nature Reviews Immunology* **12**, 669–677 (2012).
410. Li, L., Wang, B., Frelinger, J. A. & Tisch, R. T-cell promiscuity in autoimmune diabetes. *Diabetes* **57**, 2099–2106 (2008).
411. Jelcic, I. *et al.* Memory B Cells Activate Brain-Homing, Autoreactive CD4+ T Cells in Multiple Sclerosis. *Cell* **175**, 85–100.e23 (2018).
412. Wang, J. *et al.* HLA-DR15 Molecules Jointly Shape an Autoreactive T Cell Repertoire in Multiple Sclerosis. *Cell* **183**, 1264–1281.e20 (2020).
413. Lu, Y.-C. *et al.* Treatment of Patients With Metastatic Cancer Using a Major Histocompatibility Complex Class II-Restricted T-Cell Receptor Targeting the Cancer Germline Antigen MAGE-A3. *J Clin Oncol* **35**, 3322–3329 (2017).
414. Lyman, M. A. *et al.* The Fate of Low Affinity Tumor-Specific CD8+ T Cells in Tumor-Bearing Mice. *The Journal of Immunology* **174**, 2563–2572 (2005).
415. Church, S. E., Jensen, S. M., Antony, P. A., Restifo, N. P. & Fox, B. A. Tumor-specific CD4+ T cells maintain effector and memory tumor-specific CD8+ T cells. *Eur J Immunol* **44**, 69–79 (2014).
416. Zhang, H., Zhu, Z., Modrak, S. & Little, A. Tissue-Resident Memory CD4+ T Cells Play a Dominant Role in the Initiation of Antitumor Immunity. *J Immunol* **208**, 2837–2846 (2022).