



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

Amplificación de la respuesta antitumoral mediada por linfocitos T CD8⁺ de memoria residente

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Juan Pablo Saavedra Almarza

Director del Seminario de Título:

Dr. Álvaro Lladser Caldera

Director Patrocinante:

Dr. Mario Rosemblatt Silber

Agosto 2019

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr. Juan Pablo Saavedra Almarza**.

“Amplificación de la respuesta antitumoral mediada por linfocitos T CD8⁺ de memoria residente”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Director Seminario de Título: _____

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión: _____

Evaluador: _____

Santiago de Chile,

ii. BIOGRAFÍA



Juan Pablo Saavedra Almarza nació un día 24 de febrero de 1996.

A la edad de 5 años ingresó al colegio Boston College ubicado en la comuna de Maipú, donde estudió desde el Kinder hasta terminar con el 2°Básico. Continuó sus estudios en el colegio Alicante del Rosal, comuna de Maipú, cursando desde 3° básico hasta 4° medio. Egresó el año 2013 y rindió la Prueba de Selección Universitaria (PSU) ese mismo año.

Durante marzo de 2014 ingresó a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile a estudiar la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular. En el año 2017, en paralelo a sus estudios en la universidad, se unió al equipo UChile OpenBio-CeBiB y participó en la competencia internacional de biología sintética iGEM, realizada ese mismo año en Boston, Estados Unidos. Terminó sus ramos el primer semestre del año 2018 y se le otorgó el grado de licenciado el año 2019.

El 5 de Febrero de 2018 ingresó a realizar una unidad de investigación en el Laboratorio de Inmunoncología a cargo del Dr. Álvaro Lladser en la Fundación Ciencia & Vida, donde luego realizó su trabajo de Seminario de Título.

iv. AGRADECIMIENTOS

Me gustaría usar este espacio para agradecer a todos aquellos que me acompañaron durante el desarrollo de este trabajo, sin los cuales esto no habría sido posible. Por esto, quisiera agradecer primero a toda mi familia, especialmente a mis padres: Ximena y Juan, por todo el apoyo, las enseñanzas y el amor que me han brindado. No sería la persona que soy, ni estaría donde estoy de no ser por ustedes. Los amo.

A mi hermano Diego y a mis amigos Soazo, Seba, Maicky, Coté, Ed y Uva, por estar siempre dispuestos a escucharme y apoyarme cuando más los necesito. Los quiero chicos, son geniales.

No puedo dejar de mencionar a Francisca, mi consejera, amiga y pareja, a quien quisiera agradecer especialmente por todo su cariño, paciencia y apoyo incondicional. Te admiro y adoro, eres increíble.

Finalmente, a todos los integrantes del laboratorio de Inmunoncología junto a los que he crecido profesionalmente durante el transcurso de este trabajo. De todos y cada uno he aprendido y tenido muy gratos momentos y agradezco la suerte que me tocó de tenerlos de compañeros. Quiero agradecer por separado a Ximena, Evelyn, Diego, Javiera y Eduardo por la buena disposición y toda la ayuda que me brindaron. Además, quiero agradecer especialmente a Pablo, un gran compañero, amigo y ejemplo a seguir, gracias por toda tu paciencia y enseñanza, eres un grande. Por último, quisiera agradecer al líder del laboratorio, el Dr. Álvaro Lladser, por apoyarme y guiarme durante todo este trabajo y en mi formación como científico.

v. ÍNDICE DE CONTENIDOS

Biografía	ii
Agradecimientos	iv
Índice de contenidos	v
Índice de figuras	vii
Lista de Abreviaturas	viii
Resumen	
Abstract	
Introducción	1
Cáncer y tumores malignos	1
Inicio de la respuesta antitumoral	2
Respuesta antitumoral y linfocitos T CD8 ⁺	3
Linfocitos T CD8 ⁺ de memoria residente de tejido	5
Hipótesis	9
Objetivo General	9
Objetivos Específicos	9
Materiales y Métodos	10
Animales	10
Líneas Celulares	10
Anticuerpos y tinción para citometría de flujo	12
Purificación y transferencia de linfocitos T CD8 ⁺	13
Purificación del vector pVAX-OVAmb	14

Vacunación	14
Obtención de muestras de sangre	14
Eliminación de linfocitos T CD8 ⁺ circulantes	15
Desafíos y redesaríos tumorales	15
Preparación de suspensiones celulares para citometría de flujo	15
Tinción intravascular	17
Estimulación <i>ex vivo</i>	18
Análisis estadístico	18
Resultados	19
1. Evaluar si el rechazo de células tumorales mediado por linfocitos Trm de la piel promueve respuestas secundarias de linfocitos T CD8 ⁺ contra neoantígenos derivados del tumor.	19
2. Determinar la contribución de los compartimentos de memoria residente y circulante en la generación respuestas secundarias de linfocitos T CD8 ⁺ contra neoantígenos derivados del tumor.	25
3. Estudiar la capacidad antitumoral de las respuestas de linfocitos T CD8 ⁺ contra neoantígenos inducidas por linfocitos Trm.	35
Discusión	37
Conclusiones	43
Bibliografía	44

vii. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El rechazo de células MC38-OTI mediado por linfocitos Trm gatilla la generación de linfocitos T CD8 ⁺ específicos contra neoantígenos tumorales.	21
Figura 2. Los linfocitos T CD8 ⁺ específicos contra los neoantígenos tumorales expresan marcadores de activación y moléculas efectoras.	24
Figura 3. Las respuestas secundarias contra los neoantígenos tumorales generadas en presencia y ausencia del compartimento circulante son similares.	27
Figura 4. Los linfocitos OTI CD103 KO generan linfocitos Trm en piel.	30
Figura 5. Los linfocitos Trm CD103 KO son capaces de gatillar respuestas secundarias contra neoantígenos tumorales.	34
Figura 6. El rechazo de tumores de MC38-OTI mediado por linfocitos Trm permite el posterior rechazo de tumores de MC38.	36

viii. LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	: <i>Analysis of variance</i> . Análisis de varianza.
APC	: <i>Allophycocyanin</i> . Alofococianina.
APC-Cy7	: <i>Allophycocyanin-cyanine 7</i> . Alofococianina conjugada con cianina 7.
ATP	: <i>Adenosine triphosphate</i> . Adenosín trifosfato.
CD	: Cúmulo de diferenciación.
cDC1	: <i>Conventional type 1 dendritic cells</i> . Células dendríticas convencionales de tipo 1.
CO ₂	: Dióxido de carbono.
DC	: <i>Dendritic cells</i> . Células dendríticas.
DLN	: <i>Draining lymph node</i> . Linfonodo drenante.
DMEM	: <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> . Medio de Eagle modificado por Dulbecco.
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i> . Ácido desoxirribonucleico.
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
FBS	: <i>Fetal bovine serum</i> . Suero fetal bovino.
FITC	: <i>Fluorescein isothiocyanate</i> . Isotiocianato de fluoresceína.
FSC-A	: <i>Forward side scatter area</i> . Área de la señal de dispersión frontal.
FSC-H	: <i>Forward side scatter height</i> . Altura de la señal de dispersión frontal.
GZB	: Granzima B.
IFM	: Intensidad de fluorescencia media geométrica.
IL	: Interleuquina.
IFN- γ	: Interferón gama.
KO	: <i>Knock out</i> . Inactivado.

Linfocitos Trm	:	Linfocitos T CD8 ⁺ de memoria residente de tejido.
MHC	:	<i>Major histocompatibility complex</i> . Complejo principal de histocompatibilidad.
OVA	:	Ovoalbúmina.
PBS	:	<i>Phosphate buffered saline</i> . Tampón fosfato salino.
PE	:	<i>Phycoerythrin</i> . Ficoeritrina.
PE-Cy7	:	<i>Phycoerythrin-cyanine 7</i> . Ficoeritrina conjugada con cianina 7.
PerCP	:	<i>Peridin chlorophyll protein complex</i> . Complejo peridin clorofil.
PerCP-Cy5.5	:	<i>Peridin chlorophyll protein complex-cyanine 5.5</i> . Complejo peridin clorofil conjugado con cianina 5.5.
RPMI	:	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> . Medio instituto memorial parque Roswell.
SEM	:	<i>Standard error of the mean</i> . Error estándar medio.
SSC-A	:	<i>Side scatter area</i> . Área de la señal de dispersión lateral.
TCR	:	<i>T cell receptor</i> . Receptor de células T.
TNF- α	:	<i>Tumor necrosis factor α</i> . Factor de necrosis tumoral alfa.
WT	:	<i>Wild type</i> . Tipo Silvestre.

RESUMEN

Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos representan la principal arma del sistema inmune para eliminar tumores y así defendernos del cáncer. Estos surgen de la proliferación y diferenciación que tienen linfocitos T CD8⁺ vírgenes específicos, luego de ser activados por células dendríticas en los órganos linfoides secundarios. Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos reconocen a las células cancerígenas que presentan los antígenos tumorales, y median su lisis a través de la liberación de gránulos con moléculas efectoras como perforinas y granzimas, así como por medio de la secreción de citoquinas como IFN- γ y TNF- α . Los linfocitos T CD8⁺ de memoria patrullan órganos linfoides, sangre y tejidos, pudiendo brindar protección de larga duración. Recientemente se describió la existencia de linfocitos T CD8⁺ de memoria residente (Trm) los cuales se establecen permanentemente en tejidos y tumores sólidos. Los linfocitos Trm tienen un alto potencial citotóxico y promueven el reclutamiento y la activación de células dendríticas. El objetivo de este trabajo fue demostrar que los linfocitos Trm de la piel favorecen la expansión de linfocitos T CD8⁺ reactivos contra neoantígenos derivados del tumor, robusteciendo la inmunidad antitumoral. Encontramos que el rechazo de células tumorales MC38-OTI mediado por los linfocitos Trm desencadena una respuesta inmune secundaria de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos específicos contra múltiples neoantígenos derivados del tumor. Estas respuestas secundarias fueron capaces de generarse en ausencia del compartimento de memoria circulante y fueron similares a las generadas en presencia de ambos compartimentos de memoria. Además, el rechazo de células tumorales MC38-OTI mediado por los linfocitos Trm confirió protección contra células MC38 en experimentos de redesafío tumoral. Este trabajo entrega evidencia de un mecanismo por el cual los linfocitos Trm

pueden potenciar la respuesta antitumoral, amplificando la respuesta del repertorio endógeno de linfocitos T CD8⁺ contra neoantígenos derivados del tumor.

ABSTRACT

Cytotoxic CD8⁺ T cells represent the main weapon of the immune system to eliminate tumors and thus defend us against cancer. These arise from the proliferation and differentiation of specific naïve CD8⁺ T cells, after being activated by dendritic cells in the secondary lymphoid organs. Cytotoxic CD8⁺ T cells recognize tumor-antigen presenting cancer cells, and mediate their lysis through the release of granules with effector molecules such as perforins and granzymes, as well as through the secretion of cytokines such as IFN- γ and TNF- α . Memory CD8⁺ T cells patrol lymphoid organs, blood and tissues, and can provide long-lasting protection. Recently the existence of resident memory CD8⁺ T cells (Trm) which are permanently established in solid tissues and tumors was described. Trm cells have a high cytotoxic potential and promote the recruitment and activation of dendritic cells. The aim of this work was to demonstrate that Trm cells in the skin favor the expansion of CD8⁺ T cells reactive against tumor-derived neo-antigens, strengthening antitumor immunity. We found that the rejection of MC38-OTI tumor cells mediated by Trm cells triggers a secondary immune response of specific cytotoxic CD8⁺ T cells against multiple tumor-derived neo-antigens. These secondary responses were able to be generated in the absence of the circulating memory compartment and were similar to those generated in the presence of both memory compartments. In addition, the rejection of MC38-OTI tumor cells mediated by the Trm lymphocytes conferred protection against MC38 cells in tumor re-challenge experiments. This work provides evidence of a mechanism by which Trm cells can enhance the antitumor response, amplifying the response of the endogenous repertoire of CD8⁺ T cells against tumor-derived neo-antigens.

INTRODUCCIÓN

Cáncer y tumores malignos

El cáncer engloba a un conjunto de enfermedades caracterizadas por la proliferación descontrolada de las células de un tejido y su capacidad para invadir a otros tejidos en el cuerpo. Los tumores cancerosos o malignos generados en esta enfermedad, dañan e interrumpen el funcionamiento normal del tejido en el que se desarrollan. Los cánceres más frecuentes surgen de tejidos epiteliales tales como la piel, colon, mama, próstata o pulmón (Blanpain, 2013). La manera en que se trata esta enfermedad depende del tipo de cáncer y de su grado de avance, incluyendo: cirugía, quimioterapia, radioterapia o inmunoterapia (Miller y col., 2016). En la actualidad el cáncer se sitúa como una de las tres principales causas de muerte en el mundo (MINSAL, 2018) y la segunda en nuestro país, con una tasa de incidencia de 139 por cada 100.000 habitantes (MINSAL, 2016). Según el Ministerio de Salud de Chile: “Se proyecta que hacia el año 2023, el cáncer sea la principal causa de muerte en el país” (MINSAL, 2018).

El cáncer es una enfermedad multifactorial, incluyendo tanto factores internos como ambientales y/o adquiridos (Anand y col., 2008). A nivel molecular, todas estas causas comprometen el estado del material genético, propiciando la acumulación de alteraciones genéticas que pueden afectar la función de genes normalmente implicados en el crecimiento, la apoptosis o la diferenciación, lo que puede llevar a un crecimiento no regulado del número de células (Pecorino, 2012). No obstante, el sistema inmune posee mecanismos capaces de reconocer células cancerígenas y de montar una respuesta antitumoral que solo siendo superada llevará al establecimiento del tumor maligno y el progreso del cáncer.

Inicio de la respuesta antitumoral

Posterior a la aparición de células tumorales, las células dañadas, estresadas, apoptóticas o necróticas pueden liberar patrones moleculares asociados a daño celular, que potencialmente gatillan un estado de inflamación (Hernandez, 2016). Estas moléculas representan un amplio rango de entidades mediadoras, por ejemplo, proteínas de choque térmico, ATP y calreticulina, que normalmente se encuentran dentro de la célula, pero que en condiciones de estrés y muerte celular son liberadas al medio extracelular (Hernandez, 2016). Las células del sistema inmune innato, son capaces de percibir el daño y activarse a través de receptores que reconocen estas moléculas. Entre estas células se encuentran las células dendríticas (DC). Estas normalmente se encuentran patrullando, endocitando y presentando antígenos en su superficie. Cuando estas perciben el daño maduran y migran hacia órganos linfoides secundarios, donde pueden activar mediante la presentación de antígenos a los linfocitos T CD8⁺ (Guermonprez y col. 2002) y desencadenar el inicio de la respuesta adaptativa.

Los tumores, expresan una variedad de proteínas con el potencial de gatillar respuestas del sistema inmune adaptativo. Entre estas están los neoantígenos, que son moléculas generadas producto de mutaciones que cambian la secuencia aminoacídica y que no están presentes en células sanas (Schumacher & Schreiber, 2015). Por otro lado, están los autoantígenos, que son proteínas propias no mutadas que se expresan tanto en células normales como tumorales, y en determinados contextos pueden dar origen a respuestas inmunes (Houghton & Guevara-Patiño, 2004). Las respuestas frente a neoantígenos, a diferencia de los autoantígenos, no están afectadas por mecanismos

de tolerancia, son menos tóxicas para las células sanas y son específicas a las células tumorales (Efremova y col., 2017).

Cuando las DC endocitan antígenos derivados del tumor, los procesan y cargan en moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Estas moléculas son glicoproteínas polimórficas de superficie que ligan fragmentos peptídicos de los antígenos (Davis y Bjorkman, 1988). En el caso de las DC que activan a los linfocitos T CD8⁺ durante la respuesta antitumoral, los antígenos procesados son cargados en moléculas de MHC de clase I. En particular, estas moléculas se asocian a la presentación de antígenos presentes en el citosol (Hewitt, 2003). Dado que las DC endocitan los antígenos derivados del tumor, la vía para el procesamiento y presentación de estos en moléculas de MHC de clase I es diferente y se conoce como presentación cruzada (Joffre y col., 2012). Las células que principalmente realizan este proceso son las DC convencionales de tipo 1 (cDC1) (Theisen & Murphy, 2017) y son clave en el inicio de la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ contra el tumor.

Respuesta antitumoral y linfocitos T CD8⁺

Los linfocitos T CD8⁺ son células del sistema inmune adaptativo capaces de reconocer y destruir de forma específica a las células tumorales. Estos se caracterizan por la expresión de la glicoproteína CD8 y su receptor de células T (TCR) con el que reconocen péptidos específicos derivados de antígenos, típicamente de entre 8 a 10 aminoácidos, presentados en moléculas de MHC de clase I (Toebe y col., 2006). La interacción entre el TCR y su antígeno en contexto de MHC de clase I constituye la primera señal hacia la activación de los linfocitos T CD8⁺ vírgenes. Cuando esta se da en conjunto con señales coestimuladoras, como la interacción entre coestimuladores CD80 o CD86 presentes en las cDC1 con el receptor CD28 de los linfocitos T (segunda

señal); y citoquinas como la IL-12 producida por las DC (tercera señal), los linfocitos T se activan (Lanzavecchia & Sallusto, 2001) (Curtsinger & Mescher, 2010). En consecuencia de esta activación, los linfocitos T CD8⁺ vírgenes secretan citoquinas como la IL-2 que favorecen su expansión clonal y su diferenciación en linfocitos T CD8⁺ efectores (Pipkin y col., 2010) (Zhang & Bevan, 2011). Este proceso da inicio a la fase efectora de la respuesta de los linfocitos T CD8⁺.

Los linfocitos T CD8⁺ efectores resultantes del proceso de activación, expresan marcadores de superficie como el receptor de adhesión CD44 (Baaten y col., 2010) y son capaces de mediar la eliminación de células tumorales que presentan péptidos derivados de antígenos en moléculas de MHC de clase I (Durgeau, 2018). La manera en que estos linfocitos median la destrucción de las células que reconocen se basa en la liberación de gránulos con perforina, molécula que forma poros en la membrana de las células reconocidas; y granzima B (GZB), una serina proteasa que puede entrar pasivamente a través de los poros formados por la perforina e inducir apoptosis activando directa o indirectamente a la vía de las caspasas (Chávez-Galán, 2009). También, se ha descrito que los linfocitos T CD8⁺ efectores tienen la capacidad de inducir la apoptosis de la célula que reconocen a través de la vía Fas-Fas ligando y liberar citoquinas proinflamatorias como interferón gama (IFN- γ) o el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Farhood, 2018) y quimioquinas atrayentes de cDC1 (Dorner y col., 2009). En adición, los linfocitos T CD8⁺ poseen la capacidad para infiltrar tumores (Maimela y col., 2018), lo que favorece el encuentro y la destrucción de células malignas.

La respuesta antitumoral de los linfocitos T CD8⁺ efectores constituye la primera fase de la respuesta adaptativa, la fase efectora. No obstante, dado que la mayoría de estas células son de vida media corta, la fase efectora pasa por una fase de contracción

en la que sobrevive cerca del 10% de ellas, siendo estas las que dan origen a los linfocitos T de memoria (Kaech, 2002). Los linfocitos T de memoria son capaces de responder de forma rápida y eficaz frente a un nuevo encuentro con su antígeno en la fase de memoria de la respuesta adaptativa. De forma clásica, la memoria se ha dividido en dos subtipos, la memoria central y la memoria efectora. Los linfocitos T CD8⁺ de memoria central se caracterizan por circular entre los órganos linfoides secundarios y la sangre, además de ser altamente proliferativos, mientras que los linfocitos T de memoria efectora circulan a través de órganos periféricos, la sangre y el bazo; son menos proliferativos y poseen un mayor potencial citotóxico (Mueller y col., 2013).

Linfocitos T CD8⁺ de memoria residente de tejido

Durante la última década se ha descrito un nuevo subtipo de linfocitos T CD8⁺ de memoria caracterizado por ser capaz de permanecer en una amplia variedad de tejidos, entre estos piel, intestino, pulmón, tracto reproductor femenino y cerebro (Shin & Iwasaki, 2013) (Schenkel & Masopust, 2014). Estos han sido denominados linfocitos T de memoria residente (Trm) de tejidos y se ha descrito que poseen un programa transcripcional distinto a las otras subpoblaciones circulantes (Mackay et al., 2013). Los linfocitos Trm tienen un rol importante en la protección contra el cáncer, infecciones y enfermedades inflamatorias a nivel local (Nizard y col., 2017) (Mami-Chouaib y col., 2018). Se ha descrito que la infiltración de linfocitos con fenotipo Trm en tumores de pacientes con neoplasias como el cáncer de ovario, mama y pulmón se relaciona con un pronóstico favorable en el desarrollo de la enfermedad (Webb y col., 2014) (Wang y col., 2016) (Ganesan y col., 2017).

Los linfocitos Trm han sido descritos como una población heterogénea ya que al residir en distintos tejidos poseen diferentes marcadores de superficie (Topham & Reilly,

2018). No obstante, pueden ser reconocidos en barreras epiteliales como la piel de ratón, por la expresión de superficie de la lectina de tipo C CD69 (Shin & Iwasaki, 2013) y la integrina α E (CD103). La molécula CD69 es capaz de unirse al receptor 1 de esfingosina-1-fosfato (S1P1) y se piensa que su expresión limita el egreso de los linfocitos T CD8⁺ al bloquear la respuesta a los gradientes de esfingosina-1-fosfato (S1P) (Bankovich y col., 2010) (Topham & Reilly, 2018). Por otro lado, el ligando de CD103 es la E-cadherina, expresada en células epiteliales y se cree que su interacción juega un rol importante en la retención en el tejido de los linfocitos Trm (Shin & Iwasaki, 2013). De hecho, ratones *Itgae*^{-/-} carentes en la expresión de CD103 (CD103 KO) han sido utilizados como modelo de formación deficiente de linfocitos Trm en piel, mostrando que los ratones con este fenotipo son más susceptibles a la formación de melanoma que ratones silvestres (Park y col., 2018). También, en linfocitos T CD8⁺ aislados de tumores pulmonares humanos, se ha demostrado que las moléculas de CD103 se distribuyen preferentemente cerca de la sinapsis inmune formada con la célula tumoral y que facilitan la desgranulación de la vesícula citotóxica de una manera dependiente de E-cadherina (Gauthier y col., 2017). De este modo, la adaptación al tejido y la citotoxicidad mejorada dan cuenta del alto potencial de los linfocitos Trm en la protección contra cánceres sólidos humanos.

En adición a la actividad citotóxica de los linfocitos Trm, estos tienen la capacidad de activar a otras células del sistema inmune, ya que secretan altas cantidades de moléculas efectoras como IFN- γ y TNF- α . En contextos de infección viral, ha sido descrito que con la producción de IFN- γ , los linfocitos Trm gatillan un estado de alarma innato caracterizado por la producción de quimioquinas y moléculas antimicrobianas en el tejido (Ariotti y col., 2014). Asimismo, en el contexto de infección viral, los linfocitos

Trm reclutan linfocitos T CD8⁺ de memoria circulante, a través de la expresión de IFN- γ (Schenkel y col., 2013). También, se ha descrito que la producción de IFN- γ estimula la transcripción de MHC (Browne y col., 2006), lo que podría conducir a un aumento en la presentación de antígenos. Por otro lado, en tracto reproductor femenino, se ha demostrado que la producción de TNF- α resultante de la activación antígeno específica de linfocitos Trm inducidos en un modelo viral, promueve la maduración de las DC, favoreciendo la expresión de moléculas coestimuladoras como CD86 y del receptor CCR7, relacionando con la migración a linfonodos (Schenkel y col., 2014).

Los tumores suelen ser poco inmunogénicos y la actividad de los linfocitos T CD8⁺ es suprimida dentro del microambiente tumoral. Por esto, es importante promover las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ y se considera un enfoque clave de la inmunoterapia contra el cáncer (Borst y col., 2018) (Farhood, 2019). Recientemente, nuestro laboratorio ha logrado generar linfocitos Trm específicos en piel de ratón mediante vacunas de DNA (Gálvez-Cancino y col., 2018). A diferencia de los linfocitos T CD8⁺ de memoria circulante, los linfocitos Trm fueron resistentes a la eliminación dependiente de anticuerpo y pudieron suprimir fuertemente el crecimiento de un tumor que expresa el péptido inmunodominante de la proteína OVA (OVA₂₅₇₋₂₆₄ o péptido OTI), en ausencia del compartimento circulante (Gálvez-Cancino y col., 2018). También, hemos demostrado que la activación específica de los linfocitos Trm de la piel genera la secreción de IFN- γ y TNF- α , y que esta activación se corresponde con la maduración y migración a los nódulos linfáticos de cDC1 dermales (Menares, 2019).

La capacidad de los linfocitos Trm de mediar una respuesta citotóxica, generando la liberación de otros antígenos tumorales en el proceso, junto a su capacidad de producir citoquinas que favorecen a la maduración de las DC, sugieren

una posible contribución a la generación de nuevas respuestas desde los linfocitos T CD8⁺ contra nuevos antígenos tumorales (Menares, 2019). En otras palabras, la eliminación de células tumorales resultante de la respuesta inmune favorece la aparición de respuestas secundarias contra diversos antígenos. Este proceso ha sido llamado en la literatura como propagación de antígeno (del inglés *antigen spread*) y se cree que es como podrían funcionar, en parte, las inmunoterapias del cáncer (Gulley y col., 2017). Basados en este proceso, se han realizado esfuerzos previamente en nuestro laboratorio por elucidar la capacidad de los linfocitos T_{rm} de generar respuestas secundarias frente a autoantígenos derivados del tumor usando modelos de transferencia de linfocitos T CD8⁺ específicos contra autoantígenos tumorales (Menares, 2019). No obstante, aún no ha sido comprobado si la respuesta antitumoral mediada por linfocitos T_{rm} de la piel lleva a la formación de linfocitos T CD8⁺ en la población endógena, capaces de reconocer a neoantígenos provenientes del tumor. Establecer la capacidad de los linfocitos T_{rm} de generar respuestas secundarias frente al tumor y la contribución que tienen los compartimentos de memoria circulante y residente dentro de la población de linfocitos T CD8⁺ en este proceso entregará información útil en la generación y refinamiento de inmunoterapias basadas en el potencial antitumoral de los linfocitos T_{rm}.

Hipótesis

La eliminación de células tumorales mediada por linfocitos T CD8⁺ de memoria residente (Trm) de la piel es capaz de amplificar la respuesta de linfocitos T CD8⁺ del repertorio endógeno contra neoantígenos derivados del tumor.

Objetivos

Objetivo General

Establecer la capacidad de los linfocitos Trm de amplificar la respuesta de linfocitos T CD8⁺ contra neoantígenos desde el repertorio endógeno.

Objetivos Específicos

1. Evaluar si el rechazo de células tumorales mediado por linfocitos Trm de la piel promueve respuestas secundarias de linfocitos T CD8⁺ contra neoantígenos derivados del tumor.
2. Determinar la contribución de los compartimentos de memoria residente y circulante en la generación de respuestas secundarias de linfocitos T CD8⁺ contra neoantígenos derivados del tumor.
3. Estudiar la capacidad antitumoral de las respuestas de linfocitos T CD8⁺ contra neoantígenos inducidas por linfocitos Trm.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales: Se usaron ratones silvestres (WT) de la cepa C57BL/6J (CD45^{2/2}) y ratones CBy.SJL(B6)-Ptpcrca/J (CD45^{1/1}) comprados en Laboratorios Jackson además de ratones OTI CD103 WT (CD45^{1/2}) y OTI CD103 *knock out* (KO) (CD45^{1/2} y CD45^{2/2}) que fueron generados previamente en nuestro laboratorio de cruza entre los ratones CD45^{1/1}, ratones C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/J (ratones OTI) y B6.129S2(C)-*Itgae*^{tm1Cmp}/J (CD103 KO) que también provenían de Laboratorios Jackson. Los ratones OTI tienen linfocitos T CD8⁺ con un TCR transgénico compuesto por cadenas V α 2 y V β 5, con el que reconocen el complejo péptido/MHC de clase I: OVA₂₅₇₋₂₆₄/H-2 Kb (Hogquist y col., 1994). Todos los ratones fueron mantenidos en el bioterio de la Fundación Ciencia & Vida a una temperatura de 26°C a 28°C, en ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, con agua y alimento *ad libitum*. Los grupos experimentales poseían al inicio de los experimentos ratones con edades entre 5 y 25 semanas. La eutanasia de los animales, se llevó a cabo por inhalación de CO₂ y posterior dislocación cervical para asegurar la muerte del animal. Todos los experimentos se hicieron siguiendo las normas exigidas por el comité de bioética de la Fundación Ciencia & Vida y la comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT).

Líneas Celulares: La línea celular MC38 fue adquirida previamente por el laboratorio. Por otro lado, la línea MC38-OTI fue generada en el laboratorio mediante la transducción de células MC38 con lentivirus portador del plásmido pLVX-OTIx5-ZsGreen codificante para una proteína fusión que consta de 5 repetidos del péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL, péptido OTI) y la proteína fluorescente ZsGreen. Ambas líneas celulares se encontraban libres de micoplasma previo a los experimentos (fue corroborado previamente por el laboratorio mediante PCR). Las líneas celulares fueron cultivadas en placas de 100 mm

(Falcon, n° cat.: 353003) con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, del inglés *Dulbecco's modified eagle médium*, HyClone, n° cat.: SH30081.02) suplementado. El medio DMEM suplementado se preparó mezclando un 1 l de medio DMEM, 100 ml de suero fetal bovino (FBS, del inglés *fetal bovine serum*, Gibco, n° cat.: 10437-028), 10 ml de aminoácidos no esenciales encontrados en medio especial mínimo (Gibco, n° cat.: 11140-050), 10 ml de piruvato sódico (100mM) (Gibco, n° cat.: 11360-070), 10 ml GlutaMAX (dipéptido L-alanil-L-glutamina) (Gibco, n° cat.: 35050-061) y 10 ml de penicilina-estreptomina (Gibco, n° cat.: 15140122). Las células se mantuvieron en un incubador con una temperatura de 37°C y una atmósfera de 5% de CO₂. El medio de las células se cambió por medio fresco cada 2-3 días de la siguiente manera: se retiró el medio en la placa quedando las células adheridas. Se lavó con 5 ml de tampón fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate buffered saline*, Corning, n° cat.: 21-040-CVR). Se cubrió el fondo de la placa con 1 ml de tripsina-EDTA (Gibco, n° cat.: 25200-072) para luego incubarla a 37°C durante 3 minutos. Posteriormente se agregó 5 ml de medio suplementado en la placa y las células se resuspendieron para luego centrifugarlas a 400 xg durante 5 minutos. Finalmente se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en medio fresco, dividiendo la mezcla en placas de 100 mm, que se llevaron al incubador. Para los desafíos tumorales se dejaron crecer células días antes, de modo que al día de la inyección se encontraran con una confluencia cercana al 70%. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS estéril y se centrifugaron a 400 xg por 5 minutos. Además, se pasaron a través de filtros de nailon de 70 µm (Falcon, n° cat.: 352350) y se contaron con cámara de Neubauer diluyendo una pequeña muestra en azul de tripán 0,4% (Gibco, n° cat.: 15250-061) filtrado. Las células se llevaron a una concentración final de 2×10^7 células/ml en PBS estéril.

Anticuerpos y tinción para citometría de flujo: Para identificar las poblaciones celulares de interés mediante citometría de flujo se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos contra marcadores de superficie e intracelulares. La unión no específica de los anticuerpos se bloqueó utilizando 30 μ l de una dilución con el anticuerpo anti-ratón CD16/CD32 (clon 93 de Biolegend, n° cat.: 101320) y PBS durante 5 a 10 minutos a 4°C. Luego se lavó con 150 μ l de PBS y centrifugando a 872 xg, a 4°C por 2 minutos. A continuación, las muestras se incubaron durante 20 minutos a 4°C y en oscuridad con una mezcla con los respectivos anticuerpos superficiales diluidos en PBS. Los anticuerpos superficiales utilizados en los experimentos de este trabajo son: anti CD8 α -FITC (clon 53-6.7; n° cat.: 100706), anti CD8 α -APC (clon 53-6.7; n° cat.: 100712), anti CD8 α -Brilliant Violet 421 (clon 53-6.7; n° cat.: 100737), anti CD3-PerCP-Cy5.5 (clon 17A2; n° cat.: 100218), anti CD3-PeCy7 (clon 17A2; n° cat.: 100220), anti CD3-APC-Cy7 (clon 17A2; n° cat.: 100222), anti CD3-Brilliant Violet 421 (clon 17A2; n° cat.: 100228), anti TCR β -APC-Cy7 (clon H57-597; n° cat.: 109220), anti CD45-PerCP (clon 30-F11; n° cat.: 103130), anti CD45-PerCP-Cy5.5 (clon 30-F11; n° cat.: 103132), anti CD45.1-FITC (clon A20; n° cat.: 110706), anti CD45.1-PE-Cy7 (clon A20; n° cat.: 110730), anti CD45.2-FITC (clon 103; n° cat.: 109806), anti CD45.2-APC-Cy7 (clon 103; n° cat.: 109824), anti CD44-PerCP (clon IM7; n° cat.: 103036), anti CD44-Alexa Fluor488 (clon IM7; n° cat.: 103016) y el marcador de viabilidad Zombie Aqua (n° cat.: 423101); todos provenientes de Biolegend. En el caso de las tinciones intracelulares, se realizaron 2 lavados con PBS posterior a la tinción superficial y las células fueron fijadas incubándolas por 20 minutos a 4°C y oscuridad con 100 μ l de BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, n° cat.: 51-2090KZ). A continuación, se agregan 100 μ l de BD Perm/Wash (BD Biosciences, n° cat.: 51-2091KZ) diluido con agua bidestilada (Sanderson) y se centrifugó a 872 xg por 5 minutos a 4°C. El lavado anterior se repitió una vez más con

150 μ l de Perm/Wash y luego se incubó durante 20 minutos a 4°C y en oscuridad con 30 μ l de una mezcla con los respectivos anticuerpos diluidos en Perm/Wash. Los anticuerpos intracelulares utilizados son: anti IFN- γ -PE (clon XMG1.2; n° cat.: 505808), anti TNF- α -APC-Cy7 (clon: MP6-XT22; n° cat.: 506344) y anti IL-2-Pe-Cy7 (clon JES6-5H4; n° cat.: 503832) provenientes de Biolegend y anti granzima B-APC (clon GB11; n° cat.: GRB05) proveniente de Invitrogen. Finalmente, las células se lavaron 2 veces con Perm/Wash y se resuspendieron en 150 μ l de PBS.

Para el experimento de cotransferencia, se tomó una muestra de bazo y piel para contar usando CountBright Absolute Counting Beads (Thermo Fisher Scientific, n° cat.: C36950). Brevemente, una vez obtenida la suspensión celular, se diluyó en 5 ml (bazo) o 2 ml (piel) de PBS-FBS 2% (mezcla de PBS con un 2% de FBS y penicilina-estreptomina) y se tomaron 20 μ l para dejarlas en un tubo de citometría con 75 μ l de una mezcla de anti-CD45-Percp-Cy5.5 y Zombie Aqua disuelto en PBS. Se agregaron 5 μ l de las *beads* (en español cuentas o esferas) mencionadas y se adquirieron en el citómetro de flujo. Por otro lado, el resto de la muestra disuelta en PBS-FBS 2% se centrifugó por 5 minutos a 400 xg y 4°C y se continuó con la respectiva tinción. Todas las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo FACSCanto II (BD Bioscience) de la Fundación Ciencia & Vida y analizadas utilizando el *software* FlowJo versión X.0.7 (Tree Star, inc).

Purificación y transferencia de linfocitos T CD8⁺: Se purificaron linfocitos T CD8⁺ OTI CD45^{1/2}, linfocitos T CD8⁺ OTI CD103 KO CD45^{1/2} y CD45^{2/2} desde órganos linfoides secundarios de ratones hembra OTI CD45^{1/2}, OTI CD103 KO CD45^{1/2} y CD45^{2/2} mediante el uso del kit EasySep Mouse CD8⁺ T Cell Enrichment (StemCell Technologies, n° cat.: 19853). En cada experimento se transfirieron 2 x 10⁵ células en

100 µl de PBS estéril mediante inyección intravenosa en la vena de la cola. En el experimento de cotransferencia se transfirieron 2×10^5 células en una mezcla 1:1 de linfocitos T CD8⁺ OTI CD45^{1/2} y linfocitos T CD8⁺ OTI CD103 KO CD45^{2/2}.

Purificación del vector pVAX-OVAmb: El vector fue purificado desde bacterias *Escherichia coli* previamente crecidas en 1 l de medio LB (Broth, Miller formulation, VWR Life Science, n° cat.: J106-500G) con 50 mg de Kanamicina (Gibco, n° cat.: 11815024) durante aproximadamente 16 horas a 37°C y 230 rpm; utilizando el kit NucleoBond Xtra Midi EF (Macherey-Nagel, n° cat.: 740420.10). Una vez purificado, se comprobó la integridad del plásmido a través de un ensayo de restricción, utilizando las enzimas EcoRI (Thermo Scientific, n° cat.: FD0275) y XbaI (Thermo Scientific, n° cat.: FD0684).

Vacunación: Los ratones WT y CD45.1 fueron anestesiados mediante inhalación de sevoflurano al 3% (Baxter, n° cat; CEV2L9117) en cámara e inmunizados contra la proteína ovoalbumina de *Gallus gallus* inyectando vía intradérmica, en la espalda baja, 40 µg de plásmido pVax-OVAmb disuelto en 40 µl de PBS. El plásmido codifica para una proteína fusión: dominio de transmembrana/OVA. La inmunización se administró en 2 inyecciones intradérmicas (20 µl cada una) asistiendo cada inyección con 2 pulsos eléctricos de 0,05 ms y 1,125 V/cm seguidos de 8 pulsos de 10 ms y 275 V/cm (Roos y col., 2009) colocando un electrodo de agujas paralelas sobre la zona inyectada, utilizando el equipo AgilePulse (BTX Harvard Apparatus, n° cat.: 470401N).

Obtención de muestras de sangre: Se obtuvo sangre desde la vena de la cola del ratón, para esto se realizó un pequeño corte en la cola, dejando caer entre 200 y 300µl de sangre en un tubo Eppendorf de 1,6 ml con 70 µl de una solución de 500 UI/ml de heparina sódica (Sanderson, n° cat.: 75KI2088) diluida en PBS estéril para evitar la coagulación.

Eliminación de linfocitos T CD8⁺ circulantes: Luego 5 a 6 semanas después de la vacunación, se administraron 0,06 mg del anticuerpo monoclonal anti CD8 α (clon YTS 169.4, BioXCell, n $^{\circ}$ cat.: BE0117) o anti CD45.2 (clon 104.2, de BioXCell, n $^{\circ}$ cat.: BE0300) en 3 dosis de 0,02 mg dadas por vía intraperitoneal, una por día, durante 3 días consecutivos.

Desafíos y redesafíos tumorales: Cerca de 8 semanas posterior a la eliminación de los linfocitos T CD8⁺ circulantes con la administración del anticuerpo anti CD8 α , o de 1 semana con anti CD45.2, en el flanco derecho de la espalda baja del ratón, se inyectó por vía intradérmica 1 x 10⁶ células tumorales MC38 o MC38-OTI resuspendidas en 50 μ l de PBS estéril. En los grupos donde se estudió la protección frente a un redesafío, tras 12 días del desafío con MC38 OTI, se inyectó 1 x 10⁶ células tumorales MC38 en el flanco izquierdo. El crecimiento tumoral se monitoreó midiendo con un pie de metro el largo, ancho y alto del tumor, desde el día 5-6 de la inyección de células tumorales. El volumen tumoral se determinó mediante la fórmula (1), sugerida en la literatura (Faustino y col. 2013).

$$Volumen\ de\ tumor = \frac{ancho^2 * largo}{2}$$

(1)

De acuerdo a las normas de bioéticas, se llevó a cabo el sacrificio de los ratones en los que el promedio de dos mediciones distintas (ancho-largo, largo-alto o ancho-alto) fue mayor o igual a 15 mm; presentaron úlceras en el tumor y/o algún signo de dolor.

Preparación de suspensiones celulares para citometría de flujo: En relación a los nódulos linfáticos inguinales drenantes del tumor, estos se extrajeron 12 días posterior al desafío tumoral y fueron puestos en placas de 24 pocillos (Thermo scientific, n $^{\circ}$ cat.:

142475) con 0,895 a 1 ml de medio RPMI 1640 (Gibco, n° cat.: A10491-01) por pocillo y fueron disgregados con la punta de una aguja de jeringa. A continuación, se agregó a cada pocillo 105 µl de una solución preparada con 5 mg/ml de colagenasa IV (Gibco, n° cat.: 17104-019) y 5 µg/ml de DNasa I (grado II) (AppliChem, n° cat.: 9003-98-9). La placa se incubó a 37°C durante 30 minutos. La reacción enzimática se detuvo agregando 1 ml de una solución 5 mM de EDTA (Invitrogen, n° cat.: 15576-028) en medio RPMI 1640 suplementado de forma análoga a lo descrito para DMEM (Invitrogen, n° cat.: 15576-028) por pocillo. Luego, las muestras de linfonodo se disgregaron mediante micropipeta, se pasaron a través de filtros de nailon de 70 µm y se centrifugaron a 400 xg, 4°C por 5 minutos. Posteriormente se eliminó el sobrenadante por inversión, el precipitado se resuspendió en medio RPMI 1640 suplementado y se dividió la muestra según lo requerido, quedando en placas de 96 pocillos. Finalmente, las placas se centrifugaron a 872 xg, 4°C por 2 minutos y se removió el sobrenadante, quedando solo el precipitado en las placas, para su posterior estimulación y/o tinción para citometría de flujo.

Respecto a las muestras de sangre, para favorecer la lisis de eritrocitos, estas se mezclaron con 2 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos (Biolegend, n° cat.: 420301) diluido con agua bidestilada (Sanderson), se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente, se mezclaron con cerca de 13 ml de PBS y se centrifugaron a 400 xg, 4°C por 5 minutos. De la misma forma que en linfonodo, las muestras se pasaron a placas de 96 pocillos y se centrifugaron para quedar solamente los precipitados de células en la placa, pero antes de la tinción, las células se lavaron con 150 µl de PBS, centrifugándolas a 872 xg, 4°C por 2 minutos.

Las muestras de piel que se tomaron abarcaron un área cercana a 1 cm² de la espalda baja del ratón (masa cercana a 0,2 gramos), se cortaron en fragmentos pequeños y fueron digeridas enzimáticamente, de forma similar a los linfonodos. Además, fueron disgregados mecánicamente con el lado rugoso de portaobjetos de microscopía y con la micropipeta. Estas muestras se pasaron a través de filtros de nailon de 70 µm y se centrifugaron a 400 xg, a 4°C por 5 minutos. Además, se realizó una segunda digestión enzimática, resuspendiendo el precipitado de células en una solución de 1 ml de medio RPMI 1640 suplementado y 5 µl de DNasa I; y se incubó por 5 minutos en hielo. Luego se centrifugó a 400 xg, a 4°C por 5 minutos, se removió el sobrenadante y se resuspendieron las células en PBS, para pasarlas a placas de 96 pocillos. Finalmente se lavaron con 150 µl de PBS, centrifugándolas a 872 xg, 4°C por 2 minutos, 2 veces antes de la tinción con anticuerpos.

También, se procesó bazo para el análisis de cotransferencia y para compensar previo al paso de muestras de cada experimento por el citómetro de flujo. Este se extrajo de un ratón, se dejó en una placa con 5 ml de medio RPMI 1640 suplementado, se disgregó mecánicamente con el lado rugoso de portaobjetos de microscopía y se pasó a través de un filtro de nailon de 70 µm. A continuación, se agregó 1 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos y se trató igual que las muestras de sangre, para luego teñir un veinteavo de bazo con anticuerpos.

Tinción intravascular: La tinción intravascular se realizó por vía intravenosa, inyectando en la vena de la cola 300 µl de una solución con 3 µg de anti CD8β-FITC (clon YTS156.7.7; n° cat.: 126606) disueltos en PBS estéril. Los ratones fueron sacrificados 3 minutos después de la inyección.

Estimulación *ex vivo*: El procesado de linfonodo ya en la placa de 96 pocillos y centrifugado, se resuspendió en 100 μ l de medio RPMI 1640 suplementado. A continuación se le agregó 100 μ l de una solución con 0,25 μ g de un determinado neoantígeno de MC38 en medio RPMI 1640 suplementado y se incubó durante cerca de 20 horas a 37°C y 5% de CO₂. Las estimulaciones se hicieron con los neoantígenos de la línea tumoral MC38: SIIVFNLL (MUT 1) del gen *Dpagt1* (cambio de una valina por leucina subrayada), AQLANDVVL (MUT 2) del gen *Reps1* (cambio de una prolina por alanina subrayada) y ASMTNMELM (MUT 3) del gen *Adpgk* (cambio de una arginina por una metionina subrayada) (Yadav y col., 2014). Una vez pasadas 16 horas desde el inicio de la estimulación, se agregó una solución preparada con brefeldina A (Sigma-Aldrich, n° cat.: B6542) y medio RPMI 1640 suplementado, quedando la brefeldina A y el respectivo péptido a una concentración final de 1 μ g/ml. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 872 xg, a 4°C por 2 minutos y se lavaron agregando 150 μ l de PBS y centrifugándolas una vez más, quedando listas para continuar con la tinción para citometría de flujo.

Análisis estadístico: La estadística en este trabajo se realizó utilizando el *software* GraphPad Prism Versión 6.01 para Windows (La Jolla, California, USA). Los resultados se expresaron como promedios \pm el error estándar de la media del respectivo grupo. Para comparar dos grupos experimentales con una sola variable se utilizó la prueba t Mann-Whitney para datos no pareados y la prueba Wilcoxon para datos pareados. Para comparar curvas de crecimiento tumoral se usó ANOVA de dos vías y corrección de Bonferroni. Para comparar las curvas de supervivencia se hizo la prueba de Log-rank (Mantel-cox). Valores de $p \leq 0,05$ se consideraron como estadísticamente significativos con * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$.

RESULTADOS

1. Evaluar si el rechazo de células tumorales mediado por linfocitos Trm de la piel promueve respuestas secundarias de linfocitos T CD8⁺ contra neoantígenos derivados del tumor.

Se generó un modelo para estudiar si el rechazo de células tumorales mediado por linfocitos Trm de la piel promueve respuestas secundarias de linfocitos T CD8⁺ contra neoantígenos derivados del tumor (fig. 1a). Linfocitos T CD8⁺ fueron transferidos desde ratones OTI a ratones silvestres. Para generar linfocitos T de memoria, tanto residente como circulante, al día siguiente de la transferencia se inmunizó la espalda baja de los ratones con DNA codificante para OVA y se esperaron cerca de 5 semanas. Alrededor de 12 días después de la inmunización, se verificó la presencia y expansión de los linfocitos T transferidos (OTI) en sangre periférica. Estos correspondieron, en promedio, al 14,86% del total de linfocitos T CD8⁺ en sangre (fig. 1b). Para eliminar a los linfocitos T de memoria circulantes generados con la inmunización, 5 a 6 semanas después de esta, se inyectó por vía intraperitoneal el anticuerpo monoclonal anti CD8 α . Como este método elimina también a la población endógena de linfocitos T CD8⁺, se esperaron 8 semanas para su repoblamiento. Pasado el plazo mencionado, los ratones fueron desafiados inyectando en el flanco derecho de la espalda baja, por vía intradérmica, células tumorales MC38 que expresan el péptido OTI (MC38-OTI). Estas células tumorales se rechazaron cerca del día 9 posterior al desafío en todos los ratones (fig. 1c, centro). Por el contrario, el desafío con células tumorales MC38 que no expresa el péptido OTI (MC38) terminó en el crecimiento de un tumor en todos los ratones (fig. 1c, izquierda), existiendo diferencias significativas en el crecimiento tumoral entre ambos grupos (fig. 1c, derecha). A los 12 días posdesafío se evaluó la aparición de respuestas

secundarias de linfocitos T CD8⁺ contra neoepítomos (porciones inmunogénicas de neoantígenos) altamente relevantes presentes en la línea celular MC38 (Yadav y col., 2014) en el linfonodo drenante (DLN) del tumor (inguinal derecho). Para esto, las células del procesado de DLN se dividieron y se estimularon *ex vivo* con los neoepítomos MUT 1, MUT 2 y MUT 3, que provienen de mutaciones de cambio de sentido (en inglés *missense*) y se evaluó la producción de moléculas efectoras a través de tinción intracelular de citoquinas y citometría de flujo. El rechazo de células MC38-OTI mediado por linfocitos Trm resultó en la expansión de linfocitos T CD8⁺ específicos a todos los neoepítomos estudiados. Estos se detectaron como linfocitos T CD8⁺ productores de IFN- γ (IFN- γ ⁺) y constituyeron cerca del 1,5 % de la población total de linfocitos T CD8⁺ en DLN en la estimulación con cada neoepítomo (fig. 1d). En cada estimulación, el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ fue significativamente mayor al basal (cerca al 0,28%) observado en el control sin estimular (CTRL, fig. 1d). Por otro lado, el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ frente a la estimulación con los neoepítomos estudiados fue cercano al control sin estimular cuando el desafío se hizo con células MC38 (fig. 1e) o cuando los ratones no poseían linfocitos Trm específicos contra las células MC38-OTI (fig. 1f). En conjunto, estos resultados señalan que la respuesta antitumoral mediada por linfocitos Trm genera una expansión de linfocitos T CD8⁺ específicos contra los tres neoepítomos tumorales probados.

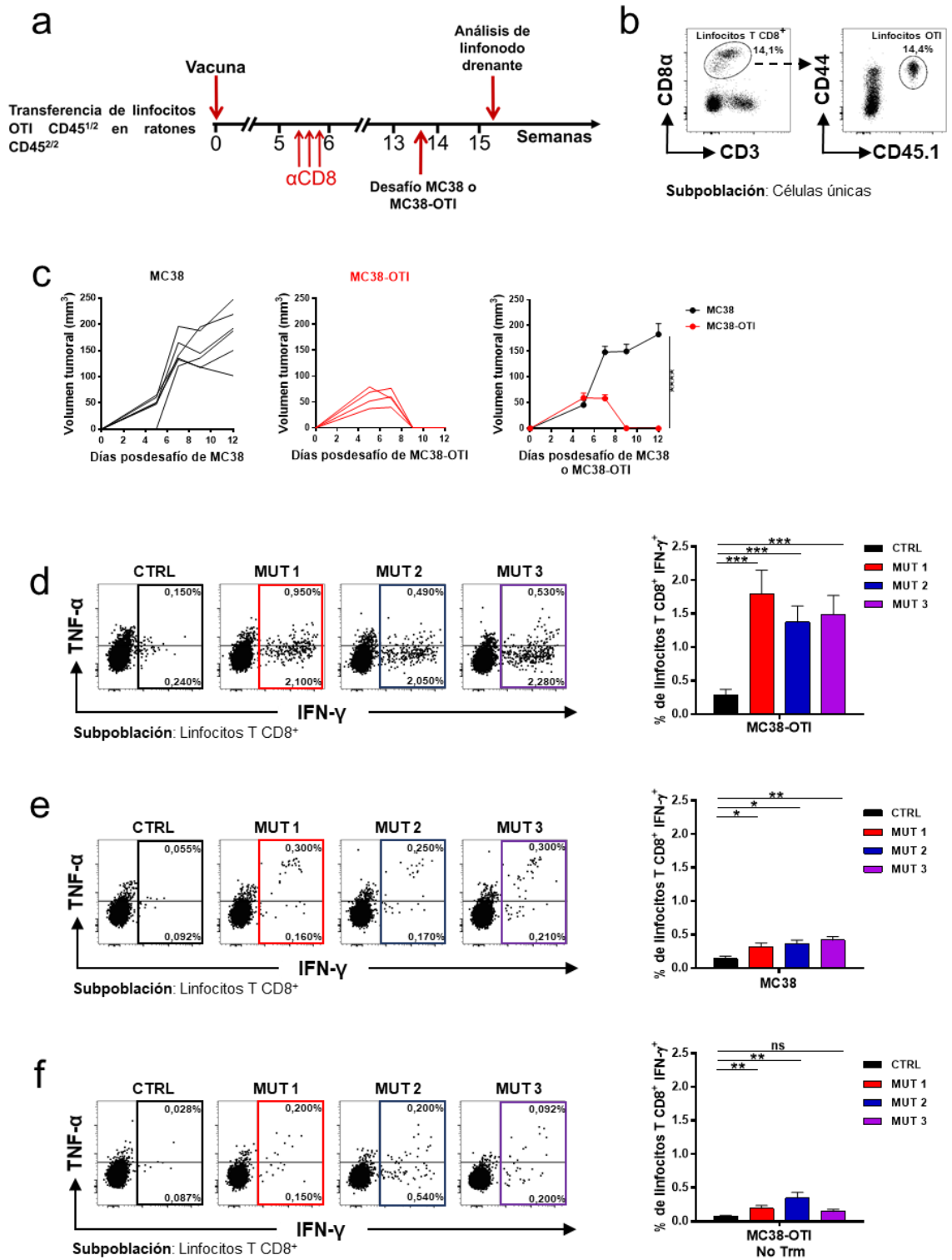


Figura 1: El rechazo de células MC38-OTI mediado por linfocitos Trm gatilla la generación de linfocitos T CD8⁺ específicos contra neoantígenos tumorales. Ratones C57BL/6 transferidos con linfocitos OTI fueron vacunados de forma intradérmica (id) contra OVA para generar memoria y 5 semanas después los linfocitos T CD8⁺ circulantes se eliminaron administrando anti CD8 α . Después de 8 semanas se inocularon 1×10^6 células MC38-OTI o MC38 de forma id y se monitoreó el crecimiento de tumores midiendo el volumen de estos en el tiempo. Ratones C57BL/6 fueron desafiados con células MC38-OTI como control (MC38-OTI no Trm). A 12 días del desafío, se estudió la producción de IFN- γ y TNF- α en la población de linfocitos T CD8 presente en DLN luego de estimulación *ex vivo* con neoepítopos de MC38 (MUT 1, MUT 2 y MUT 3) mediante tinción intracelular de citoquinas y citometría de flujo. **(a)** Esquema experimental. **(b)** (Izquierda) Gráfico de puntos representativo, muestra la expresión de CD8 α y CD3 de la subpoblación de células únicas y señala (dentro de una elipse) la población de linfocitos T CD8⁺ totales en sangre periférica 12 días de la inmunización. (Derecha) Gráfico de puntos representativo, señala la producción de CD44 y CD45.1 dentro de la subpoblación de linfocitos T CD8⁺ y se encierra en una elipse la población de linfocitos OTI transferida. **(c)** (Izquierda y centro) Curvas individuales que muestran el crecimiento tumoral de los animales desafiados con células MC38 (curvas en negro) o MC38-OTI (curvas en rojo). (Derecha) Gráfico representativo en donde se compara el promedio del crecimiento tumoral de cada grupo hasta el día en que un ratón muere. **(d, e y f)** (Izquierda) Gráficos de puntos representativos que muestran la expresión de TNF- α e IFN- γ y encierran en un rectángulo la población de linfocitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ en muestras no estimuladas (CTRL) y estimuladas con los neoepítopos estudiados en DLN de tumores MC38-OTI en grupos con **(d)** y sin **(f)** linfocitos Trm y tumores MC38 **(e)**. (Derecha) Frecuencia de linfocitos T CD8⁺ productores de IFN- γ en DLN del tumor en relación a la población total de linfocitos T CD8⁺. Los gráficos muestran los datos agrupados de dos experimentos independientes con n= 6 para el grupo MC38, n=8 para el grupo MC38-OTI y n=9 para el grupo MC38-OTI no Trm. Los gráficos de crecimiento tumoral son representativos y tienen un n=4 para el grupo MC38-OTI. Las barras en los gráficos indican el promedio \pm el error estándar medio (SEM). Los datos de crecimiento tumoral fueron analizados mediante ANOVA de dos vías y corrección de Bonferroni, mientras que los porcentajes de linfocitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ respecto al total de linfocitos T CD8⁺ fueron analizados mediante un test de Mann-Whitney no pareado, indicando con * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$, las diferencias significativas y con ns la falta de estas.

Para lograr una mejor caracterización de los linfocitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ y de su potencial citotóxico se analizó la expresión del marcador de activación CD44 (fig. 2a) y de moléculas efectoras como TNF- α (fig. 2b), GZB (fig. 2c) e IL-2 (fig. 2d). El análisis indicó niveles significativamente altos de expresión de CD44 en los linfocitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ en relación a las células que no produjeron IFN- γ . Esto se observó al comparar la intensidad de fluorescencia media geométrica (IFM) de CD44 normalizada, que fue cerca de 21 veces mayor en los linfocitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ respecto a los no productores de IFN- γ , frente a la estimulación con cualquiera los neoepítomos (fig. 2a). Esto corroboró su activación específica frente a los neoepítomos tumorales estudiados. Además, los linfocitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ tuvieron una IFM normalizada cerca de 2,7, 5,5 y 2,7 veces más de TNF- α (fig. 2b), GZB (fig. 2c) e IL-2 (fig. 2d), respectivamente, que los linfocitos T CD8⁺ IFN- γ ⁻, frente a la estimulación con los neoepítomos tumorales. Asimismo, la expresión de las moléculas efectoras estudiadas desde los linfocitos T productores de IFN- γ fue significativamente mayor que en los no productores de IFN- γ , lo que fue consistente con su actividad antitumoral citotóxica. En conjunto estos resultados sugieren que los linfocitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ específicos observados en la estimulación con los neoepítomos tumorales estudiados son citotóxicos y expresan moléculas efectoras.

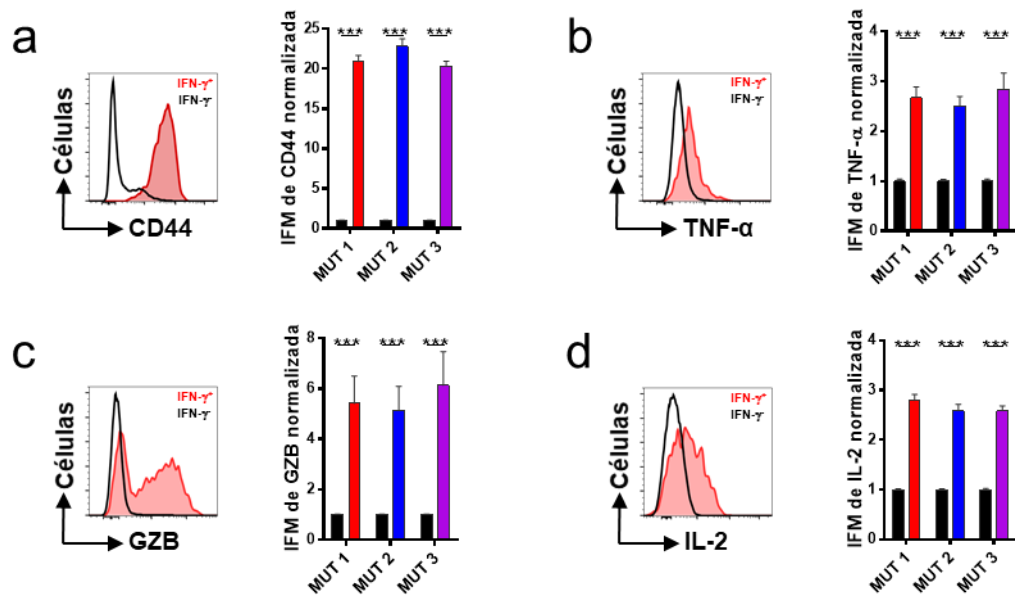


Figura 2: Los linfocitos T CD8⁺ específicos contra los neopéptidos tumorales expresan marcadores de activación y moléculas efectoras. Luego de la estimulación con los neopéptidos tumorales y tinción intracelular de citoquinas, se analizó la expresión de marcadores de activación y moléculas efectoras en los linfocitos productores de IFN- γ del grupo con linfocitos Trm desafiado con MC38-OTI. **(a-d)** (izquierda) Histogramas representativos que muestran la expresión de CD44 **(a)**, TNF- α **(b)**, granzima B (GZB) **(c)** e IL-2 **(d)** en los linfocitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ (en rojo) y los IFN- γ ⁻ (en negro) en cada estimulación. (Derecha) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media geométrica (IFM) normalizada de CD44 **(a)**, TNF- α **(b)**, GZB **(c)** e IL-2 **(d)** de las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ (barra roja) e IFN- γ ⁻ (barra negra) en cada estimulación. El número de células en los histogramas se muestra en escala modal. La normalización de IFM se realizó relativa a la IFM promedio de linfocitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺. Los gráficos se realizaron con los datos de todos los ratones del grupo MC38-OTI (n=8). Las barras en los gráficos indican el promedio \pm el SEM. Los datos fueron analizados mediante un test de Mann-Whitney no pareado, indicando con * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$, las diferencias significativas.

2. Determinar la contribución de los compartimentos de memoria residente y circulante en la generación de respuestas secundarias de linfocitos T CD8⁺ contra neoantígenos derivados del tumor.

Se evaluó la contribución de la memoria residente en la generación de respuestas secundarias. Para esto, similar a la fig. 1a, se comparó el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ en DLN frente a una estimulación con neoepítomos tumorales, generado luego del rechazo de células MC38-OTI, entre grupos sin (Ctrl) y con (anti CD8 α) eliminación de la memoria circulante. De esta manera fue posible comparar las respuestas secundarias en un grupo que presentaba ambos compartimentos de memoria con uno que solo presentaba memoria residente. En ambos casos, existe un porcentaje de linfocitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ frente a la estimulación con todos los neoepítomos tumorales probados que es significativamente mayor al del control sin estimular (CTRL) (fig. 3a). Pese a que no se encontraron diferencias significativas entre el grupo anti CD8 α y el grupo Ctrl en cuanto a la generación de respuestas secundarias, sí se observa una tendencia que aparenta un porcentaje de linfocitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ mayor en el grupo anti CD8 α respecto al Ctrl. No obstante, el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ totales respecto a las células vivas en el grupo Ctrl fue cerca de 2 veces más alto que en el grupo anti CD8 α (fig. 3b). Teniendo en cuenta el resultado anterior, se compararon las respuestas secundarias en función del porcentaje de linfocitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ respecto al total de células vivas (fig. 3c). Este análisis mostró que las respuestas secundarias generadas en el grupo Ctrl fueron similares a las del grupo anti CD8 α ya que no existieron diferencias significativas entre ambos grupos (fig. 3c). Además, la expansión de los linfocitos T CD8⁺ específicos a los neoepítomos probados tendió a ser menor en el grupo anti CD8 α respecto al Ctrl (fig. 3c), lo que sugiere una posible contribución de la memoria

circulante en el proceso. Estos resultados sugieren que la actividad antitumoral de los linfocitos T_{rm} es capaz de gatillar respuestas secundarias frente a neoantígenos tumorales que son similares a las producidas por la acción antitumoral conjunta de la memoria residente y circulante.

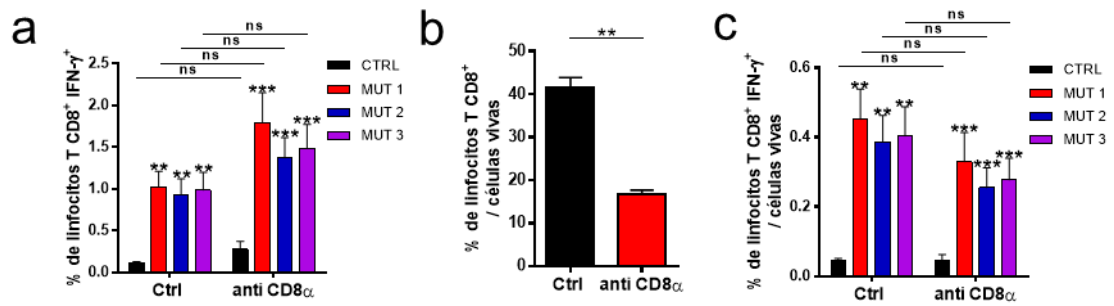


Figura 3: Las respuestas secundarias contra los neoantígenos tumorales generadas en presencia y ausencia del compartimento circulante son similares. Se comparó la generación de respuestas secundarias frente a neoantígenos tumorales entre grupos con (Ctrl) y sin (anti CD8α) memoria circulante, de forma similar a lo indicado en la fig. 1, pero administrando PBS al grupo Ctrl en lugar de anti CD8α. **(a)** Frecuencia de linfocitos T CD8⁺ productores de IFN-γ⁺ en DLN del tumor en relación a la población total de linfocitos T CD8⁺ del grupo Ctrl y del grupo anti CD8α en cada estimulación. **(b)** Frecuencia de linfocitos T CD8⁺ en DLN del tumor en relación a la población de células vivas de ambos grupos. Los porcentajes se tomaron desde las muestras CTRL sin estimular. **(c)** Frecuencia de linfocitos T CD8⁺ productores de IFN-γ⁺ en DLN del tumor en relación a la población de células vivas de ambos grupos en cada estimulación. Los gráficos muestran los datos de un solo experimento con n=5 para el grupo Ctrl y dos experimentos independientes agrupados con n=8 para el grupo anti CD8α. Las barras en los gráficos indican el promedio ± SEM. Los datos fueron analizados mediante un test de Mann-Whitney no pareado, indicando con * p≤0,05, ** p≤0,01 y *** p≤0,001, las diferencias significativas y con ns la falta de estas entre los grupos Ctrl y anti CD8α, y entre cada estimulación respecto al CTRL sin estimular.

Para estudiar la contribución del compartimento de memoria circulante en la generación de respuestas secundarias frente a neoantígenos tumorales fue necesario utilizar un modelo que careciera de linfocitos Trm específicos. En trabajos previos se han utilizado ratones con el gen de CD103 inactivado (KO) como modelo deficiente en la función de linfocitos Trm en piel (Park y col., 2018). Para corroborar que linfocitos T CD8⁺ CD103 KO son deficientes en la formación de linfocitos Trm en piel se cotransfirieron linfocitos T OTI CD8⁺ CD103 KO CD45^{2/2} (indicados como OTI KO) con linfocitos T OTI CD8⁺ CD45^{1/2} (indicados como OTI WT) en ratones CD45^{1/1}. Los ratones cotransferidos fueron inmunizados contra OVA mediante vacunación con DNA y se esperaron 4 semanas para el análisis (fig. 4a). Debido a que no se pueden reconocer a los linfocitos Trm provenientes de linfocitos OTI KO a través de la tinción de CD103, en fase de memoria se realizó una tinción intravascular con anti CD8 β previo al sacrificio, y se analizó el bazo y la piel. Ha sido descrito en la literatura que linfocitos T que expresan CD69 como marcador de residencia en tejidos no linfoides son resistentes a la tinción intravascular (Anderson y col., 2014). Si bien, todos los linfocitos T CD8⁺ expresan CD8 β , solo los que se encuentran en circulación se marcan con la tinción intravascular (Anderson y col., 2014). En bazo, las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ endógena, OTI WT y OTI KO se pudieron diferenciar entre sí, dentro de la subpoblación de linfocitos T CD8⁺ totales, gracias a los marcadores congénitos que expresan (fig. 4b). Además, al día del análisis, las poblaciones transferidas fueron similares tanto en porcentaje de linfocitos OTI respecto a las células hematopoyéticas (CD45⁺) como en números totales en bazo, sin diferencias significativas entre ambos grupos (Fig. 4c). De manera similar, los linfocitos transferidos y endógenos se pudieron distinguir entre sí en la piel (Fig. 4d). Además, se analizó la presencia de linfocitos con fenotipo residente (CD8 β ⁻) en piel, provenientes de las células transferidas. Inesperadamente, se observaron porcentajes similares de

células CD8 β ⁻ provenientes de ambas poblaciones transferidas, siendo principalmente CD103⁺ aquellas que provienen de linfocitos OTI WT y obviamente CD103⁻ aquellas que provienen de linfocitos OTI KO (Fig. 4d). Esta similitud se observó también al comparar el porcentaje de linfocitos Trm específicos contra OVA provenientes de linfocitos OTI WT o KO transferidos respecto al total de células hematopoyéticas en piel (Fig. 4e, izquierda), donde no hubieron diferencias significativas entre los grupos. Asimismo, la comparación del número de linfocitos Trm específicos contra OVA provenientes de linfocitos OTI WT o KO transferidos por gramo de piel fue similar entre ambos grupos, sin diferencias significativas entre ellos. Estos resultados sugieren que los linfocitos T CD103 KO podrían generar linfocitos Trm en piel en la fase de memoria de la inmunización, en cantidades similares a los linfocitos OTI WT.

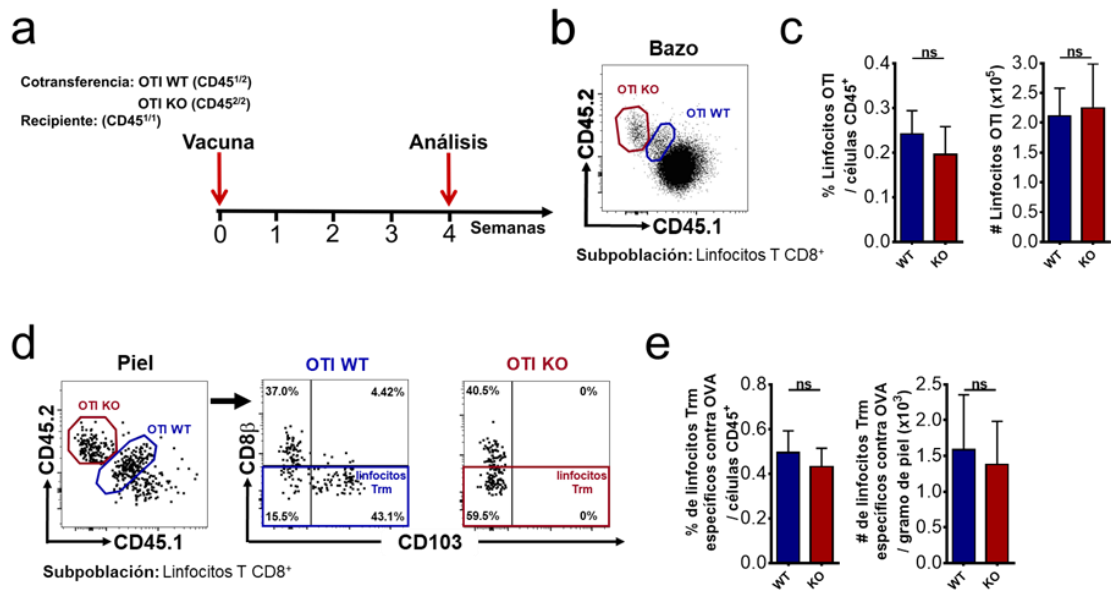


Figura 4: Los linfocitos OTI CD103 KO generan linfocitos Trm en piel. Ratones CD45^{1/1} cotransferidos con 1x10⁵ linfocitos OTI CD103 WT (CD45^{1/2}, abreviados OTI WT) y con 1x10⁵ linfocitos OTI CD103 KO (CD45^{2/2}, abreviados OTI KO) fueron inmunizados contra OVA. A 4 semanas de la inmunización se analizó bazo y piel. **(a)** Esquema experimental. **(b)** Gráfico de puntos representativo, muestra la expresión de CD45.2 y CD45.1 de la subpoblación de linfocitos T CD8⁺ en bazo y señala las poblaciones transferidas (OTI KO en azul y OTI WT en rojo). **(c)** (Izquierda) Frecuencia de linfocitos OTI WT y KO en relación a las células hematopoyéticas (CD45⁺). (Derecha) Número total (indicado como #) de linfocitos OTI WT y KO en bazo. **(d)** (Izquierda) Gráfico de puntos representativo, muestra la expresión de CD45.2 y CD45.1 de la subpoblación de linfocitos T CD8⁺ en piel y señala las poblaciones transferidas (OTI KO en azul y OTI WT en rojo). (Derecha) Gráficos de puntos representativos, muestra la tinción con CD8β y la expresión de CD103 en la subpoblación de linfocitos OTI WT y KO, encerrando la población de linfocitos Trm (CD8β⁺). **(e)** (Izquierda) Frecuencia de linfocitos Trm OTI WT y KO en relación a las células hematopoyéticas (CD45⁺) en piel. (Derecha) Número total de linfocitos con Trm OTI WT y KO por gramo de piel. Los gráficos muestran los datos de un solo experimento por grupo. Para los análisis en bazo se tuvo un n=5 por grupo mientras que para la piel un n=4. Las barras en los gráficos indican el promedio ± SEM. Los datos fueron analizados mediante un test de Wilcoxon para datos pareados, indicando con * p≤0,05, ** p≤0,01 y *** p≤0,001, las diferencias significativas y con ns la falta de estas.

También se evaluó la capacidad de linfocitos Trm de la piel derivados de linfocitos OTI CD103 WT y KO en un modelo en donde se elimina específicamente a la población circulante de los linfocitos T transferidos, a través de la administración de anti CD45.2 en lugar de anti CD8 α (Fig. 5a). Ratones CD45^{1/1} fueron transferidos con linfocitos OTI CD45^{1/2} WT u OTI KO un día antes de inmunizarlos contra OVA, a través de la vacuna con DNA. A 12 días de la inmunización, se verificó la presencia y expansión de los linfocitos transferidos en sangre periférica (Fig. 5b). Tanto en el grupo con linfocitos OTI WT como con el que tiene OTI KO fue posible detectar las poblaciones transferidas a través de sus marcadores congénitos (Fig. 5b, izquierda). También se observó que el porcentaje de linfocitos transferidos respecto a la población total de linfocitos T CD8⁺ en sangre tendió a ser menor cuando las células transferidas eran OTI KO, aunque no existieron diferencias significativas entre los grupos (Fig. 5b, izquierda). Además, se observó una mayor dispersión en los datos asociados al porcentaje de expansión de los linfocitos OTI KO respecto a los OTI WT (fig. 5b, izquierda). Para evaluar la generación de respuestas secundarias contra los neoantígenos tumorales estudiados con y sin la presencia de la memoria circulante, se administró PBS (Ctrl) o anti CD45.2 respectivamente. Dado que la administración de anti CD45.2 evita la eliminación de la población endógena de linfocitos T CD8⁺ que ocurría al administrar anti CD8 α (ya que la población endógena es CD45^{1/1}), solo se esperó una semana antes de desafiar con células MC38-OTI. A los 12 días del desafío, el tumor se había rechazado o reducido a volúmenes cercanos a cero en todos los grupos (datos no mostrados) y se analizaron los DLNs inguinales.

Se analizó el porcentaje de linfocitos T transferidos en todos los grupos, caracterizados por la expresión del marcador congénito CD45.2 (Fig. 5c). El porcentaje promedio de

linfocitos OTI WT en el grupo Ctrl fue mayor que en el grupo CD45.2, siendo en el primero cerca del 1,61% de la población total de linfocitos T CD8⁺, mientras que en el segundo fue cercano a cero (0,14%), existiendo diferencias significativas entre ambos grupos en DLN (fig. 5c, izquierda). Asimismo, la fig. 5c (derecha) muestra que el porcentaje promedio de linfocitos OTI KO en el grupo Ctrl fue mayor que en el grupo CD45.2, siendo en el primero cerca del 1,94% de la población total de linfocitos T CD8⁺. Estos resultados indican que la eliminación mediante la administración de anti CD45.2 del compartimento de linfocitos T CD8⁺ circulante transferidos fue efectiva.

Al igual que en la fig. 1d, la aparición de respuestas secundarias frente a neoantígenos tumorales se relacionó con la aparición de linfocitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ luego de estimular con los neoepítomos tumorales. Al comparar con el control sin estimular, en cada grupo, se observó una expansión de linfocitos T CD8⁺ específicos a los neoepítomos probados, existiendo diferencias significativas en casi todas las comparaciones, menos entre el control sin estimular y la estimulación con MUT 1 en el grupo OTI KO Ctrl, (Fig. 5d). Tanto en presencia como en ausencia de linfocitos T CD8⁺ de memoria circulante aparecieron respuestas secundarias contra los neoantígenos tumorales probados, que fueron parecidas, sin diferencias significativas entre ambos grupos (fig. 5d, izquierda). Sin embargo, de forma similar a lo mostrado en la fig. 3c, el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ observado en las muestras estimuladas con cualquiera de los neoepítomos probados tendió a ser mayor en el grupo Ctrl que en el anti CD45.2 (fig. 5d, izquierda y derecha). Por otro lado, se evidenciaron respuestas secundarias de mayor magnitud y dispersión en los grupos transferidos con linfocitos OTI KO, incluso en el grupo tratado con anti CD45.2 (fig. 5d, derecha). No obstante, no existieron diferencias significativas entre los grupos con linfocitos OTI KO y OTI WT (datos no mostrados). Además, los

linfocitos productores de IFN- γ en todos los grupos, luego de la estimulación con los neoepítomos tumorales, produjeron moléculas efectoras como TNF- α , GZB e IL-2 (Datos no mostrados). Estos resultados, corroboran la importante contribución de los linfocitos Trm para generar respuestas secundarias contra los neoantígenos antitumorales estudiados e interesantemente demuestran que el modelo CD103 KO podría llegar a formar linfocitos Trm en piel capaces de gatillar respuestas secundarias de los linfocitos T CD8⁺ frente a neoantígenos derivados del tumor en porcentajes similares a las formadas por linfocitos WT.

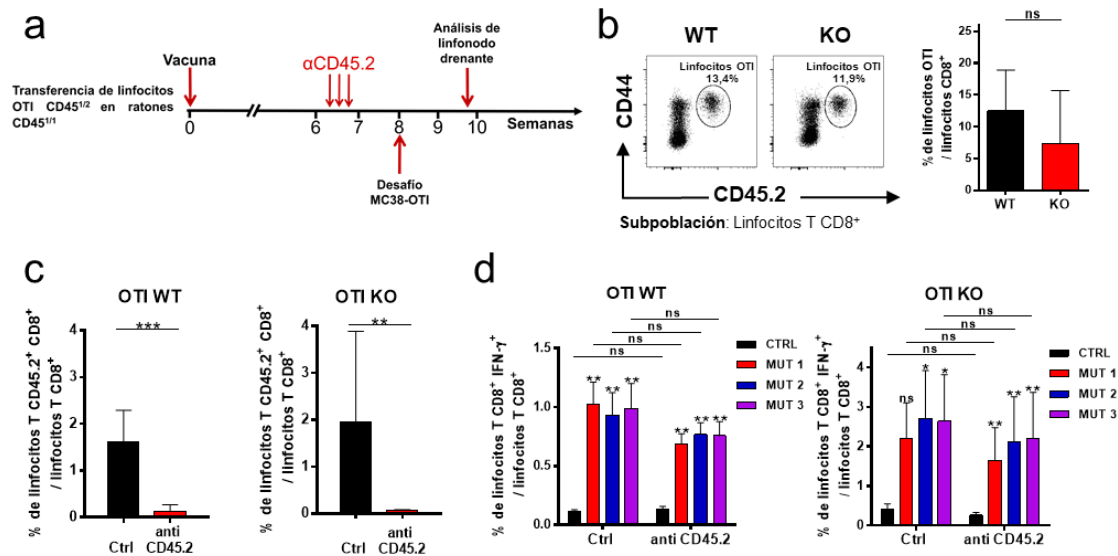


Figura 5: Los linfocitos Trm CD103 KO son capaces de gatillar respuestas secundarias contra neoantígenos tumorales. Ratones CD45^{1/1} transferidos con linfocitos OTI WT o linfocitos OTI KO (ambos CD45^{1/2}) fueron vacunados con DNA codificante para OVA. Durante la fase de memoria se eliminó específicamente a los linfocitos OTI circulantes administrando anti CD45.2. Una semana después se inocularon 1×10^6 células MC38-OTI id. A 12 días del desafío se estudió, en DLN, la aparición de respuestas contra neoepítomos de MC38, mediante tinción intracelular de citoquinas y citometría de flujo. **(a)** Esquema experimental. **(b)** (Izquierda) Gráfico de puntos representativo, señala la producción de CD44 y CD45.2 dentro de la subpoblación de linfocitos T CD8⁺ en sangre periférica 12 días después de la inmunización y se encierra en una elipse la población de linfocitos OTI transferida. (Derecha) Frecuencia de linfocitos OTI WT y KO en relación a la población de linfocitos T CD8⁺ en sangre. **(c)** Frecuencia de linfocitos OTI WT y KO (linfocitos T CD45.2⁺ CD8⁺) en relación a la población total de linfocitos T CD8⁺ en DLN de ratones con o sin (Ctrl) anti CD45.2, en el día del análisis. **(d)** Frecuencia de linfocitos T CD8⁺ productores de IFN- γ en DLN del tumor en relación a la población total de linfocitos T CD8⁺ del grupo Ctrl y anti CD45.2. (Izquierda) análisis de muestras de ratones transferidos con linfocitos OTI WT. (Derecha) análisis de muestras de ratones transferidos con linfocitos OTI KO. Los gráficos muestran los datos de un solo experimento con n=5 para todos los grupos menos los grupos anti CD45.2 OTI WT y Ctrl OTI KO en la fig. 5c, con n=9 y n=8 respectivamente. Las barras en los gráficos indican el promedio \pm SEM. Los datos fueron analizados mediante un test de Mann-Whitney no pareado, indicando con * p \leq 0,05, ** p \leq 0,01 y *** p \leq 0,001, las diferencias significativas y con ns la falta de estas entre Ctrl y anti CD45.2, y entre estimulación y CTRL.

3. Estudiar la capacidad antitumoral de las respuestas de linfocitos T CD8⁺ contra neoantígenos inducidas por linfocitos Trm.

Finalmente, para estudiar el efecto *in vivo* de las respuestas secundarias gatilladas por los linfocitos Trm, se llevó a cabo una estrategia experimental similar a la de la fig. 1a, pero esta vez los ratones recibieron un redesafío con células MC38 que no expresan el péptido OTI (Fig. 6a). Como control se usó un grupo que no se desafió previamente con células MC38-OTI. El primer tumor, MC38-OTI, fue rechazado cerca del día 9 en todos los ratones (Fig. 6b). Al día 23 del primer desafío se redesafió con células MC38 y se desafió el grupo control. Las curvas individuales de crecimiento tumoral mostraron que todos los ratones que rechazaron el tumor MC38-OTI rechazan también el tumor MC38, mientras que el tumor creció en todos los ratones del grupo control (no desafiado) (Fig. 6c). Como era de esperar la comparación entre las curvas promedio de crecimiento tumoral mostró diferencias significativas entre ambos grupos (Fig. 6c), al igual que la comparación entre las curvas de supervivencia (Fig. 6d). Estos resultados muestran que los ratones que rechazaron el tumor MC38-OTI fueron capaces de rechazar células MC38 que expresan los neoepítomos tumorales estudiados en este trabajo, pero que no pueden ser reconocidos por los linfocitos Trm generados, específicos contra OVA.

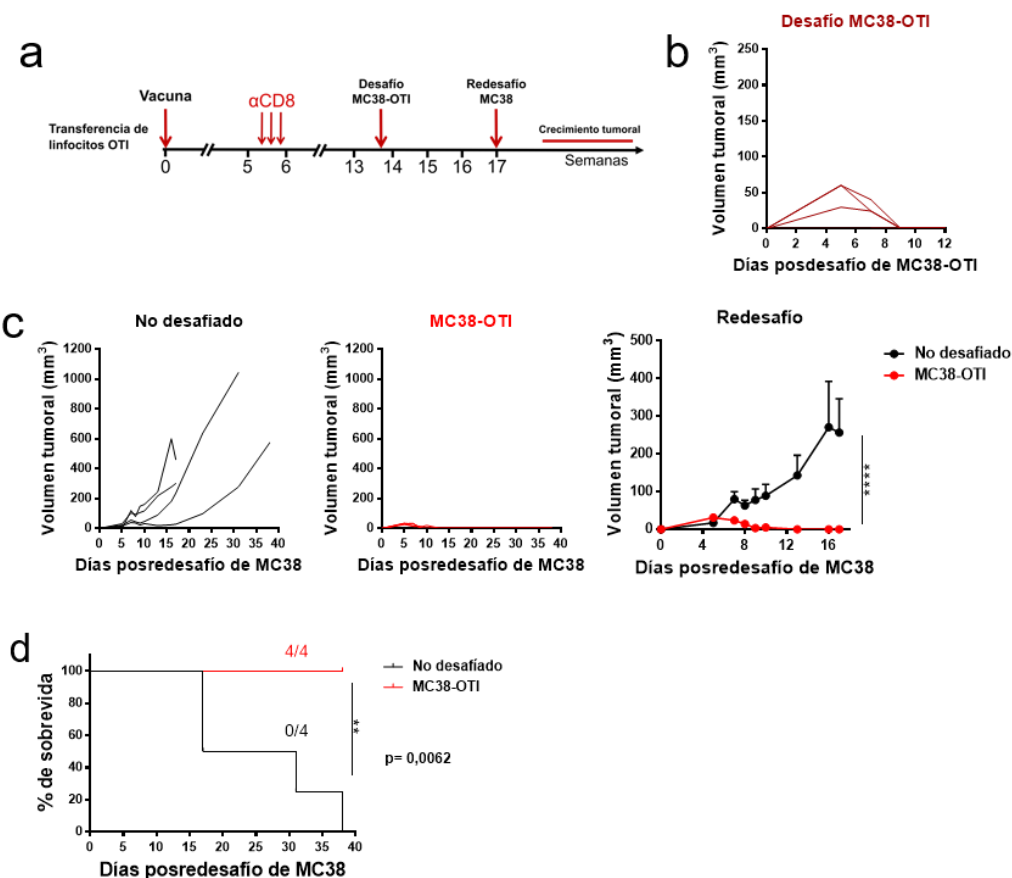


Figura 6: El rechazo de tumores de MC38-OTI mediado por linfocitos Trm permite el posterior rechazo de tumores de MC38. Ratones C57BL6/J con linfocitos Trm específicos contra OVA y que carecen de su contraparte circulante fueron desafiados con 1×10^6 células MC38-OTI id. A 12 días del desafío se inyectaron 1×10^6 células MC38 id y se monitoreó el crecimiento tumoral. **(a)** Esquema experimental. **(b)** Curvas individuales de crecimiento tumoral durante el desafío. **(c)** (Izquierda) Curvas individuales de crecimiento del tumor MC38 en ratones del grupo control (no desafiado, curvas en negro) o del redesiado (MC38-OTI, curvas en rojo). (Derecha) Gráfico representativo, compara el crecimiento tumoral promedio de cada grupo hasta el día en que un ratón muere. **(d)** Comparación de curvas de sobrevivida de ambos grupos, indicando el número de ratones vivos respecto al total el último día de medición. Los gráficos muestran los datos de un solo experimento con $n=4$ por grupo. Las barras en las curvas promedio indican el SEM. Los datos de crecimiento tumoral se compararon mediante ANOVA de dos vías y corrección de Bonferroni. Para comparar las curvas de sobrevivida se hizo la prueba de Log-rank (Mantel-cox). Valores de $p \leq 0,05$ se consideraron como estadísticamente significativos con * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

DISCUSIÓN

Recientemente, se ha empezado a estudiar el papel de los linfocitos Trm y se ha encontrado evidencia de que estos cumplen un rol central en la respuesta antitumoral (Enamorado y col, 2017) (Gálvez-Cancino y col., 2018) (Park y col., 2018). La capacidad de los linfocitos Trm de alertar al sistema inmune innato y adaptativo mediante producción de citoquinas y de producir moléculas citotóxicas, forman parte de los mecanismos descritos por los que confieren protección antitumoral. En este trabajo se entrega evidencia de un mecanismo diferente por el que los linfocitos Trm median, de forma indirecta, protección frente a tumores sólidos. En este mecanismo, la eliminación de células tumorales mediada por los linfocitos Trm propicia la liberación y presentación de neoantígenos tumorales a linfocitos T CD8⁺ específicos, por ejemplo, a través de células cDC1, activándolos y generando nuevas respuestas contra el tumor. Esto se vio reflejado en la expansión de nuevos linfocitos T CD8⁺ específicos a los neoepítopos MUT 1, MUT 2 y MUT 3, en ratones con linfocitos Trm que rechazaron el tumor, respecto a los controles sin linfocitos Trm. Por otro lado, el hecho de que los linfocitos que respondieron de forma específica a la estimulación fueran capaces de producir moléculas efectoras demuestra que también son capaces de mediar citotoxicidad directamente sobre las células tumorales. Por ende, estos constituyen parte de las próximas respuestas contra el tumor. Estos resultados confirman nuestra idea, respecto a que los linfocitos Trm no solo alertan al sistema inmune innato y median la destrucción directa de células tumorales, sino que además aportan en la educación de nuevos linfocitos T CD8⁺ citotóxicos específicos contra neoantígenos, que atacaran al tumor. Este aporte se puede deber a la liberación de antígenos tumorales resultantes de su capacidad citotóxica, además de la activación de células dendríticas capaces de hacer

presentación cruzada, como las cDC1 presentes en la piel, mediante la liberación de citoquinas como IFN- γ o TNF- α . De este modo, las cDC1 activadas pueden migrar y presentar en el DLN los antígenos tumorales y activar a linfocitos T CD8⁺ reactivos a dichos péptidos.

La generación de respuestas secundarias frente a neoantígenos tumorales producto del rechazo de un tumor podría darse en mayor o menor medida también por la actividad de otras células con esta capacidad, como los linfocitos T CD8⁺ de memoria circulante. En este trabajo evidenciamos que estas respuestas se generan aún en ausencia de la población de memoria circulante en dos modelos diferentes (fig. 3c y 5d). También estas respuestas no fueron significativamente distintas a las generadas en presencia de la memoria circulante. Esto evidencia nuevamente el gran potencial antitumoral que presenta la memoria residente, que además de su capacidad citotóxica y de alertar al sistema inmune, cumple un rol importante en la educación de nuevos linfocitos T CD8⁺ para gatillar respuestas frente al tumor.

Los linfocitos T CD8⁺ de memoria circulante también podrían contribuir en la amplificación de las respuestas contra tumores a través de la amplificación del repertorio de linfocitos T CD8⁺ contra neoantígenos tumorales. Esto se trató de estudiar utilizando linfocitos OTI CD103 KO, en donde la persistencia de los linfocitos T_{rm} se ve deteriorada (Mackay y col., 2013). Ratones CD103 KO se han utilizado para estudiar si la generación de linfocitos T_{rm} es requerida para el control del melanoma en estudios previos (Park y col., 2018). En este trabajo, a través de experimentos de cotransferencia, se demostró que a la cuarta semana desde la inmunización, linfocitos T CD8⁺ CD103 KO pueden formar linfocitos T_{rm} en piel en un porcentaje similar a linfocitos T CD8⁺ silvestres. En 2013, un estudio demostró que en experimentos de cotransferencia, luego de la

exposición de un patógeno viral, ratones transferidos con linfocitos T CD103 KO con un TCR específico contra el patógeno formaban, entre las semanas 4 y 5 posterior a la exposición, cerca de 4 veces menos linfocitos Trm en piel que la contraparte CD103 WT y cerca de 8 veces menos entre las semanas 9 y 11 (Mackay y col., 2013). De este modo, los resultados obtenidos en este trabajo discrepan con la literatura actual. Sin embargo, esto se puede deber a la forma en que se generaron los linfocitos Trm en piel. En el trabajo citado (Mackay y col., 2013), los autores generan linfocitos Trm específicos en piel infectando epicutáneamente con virus mediante escarificación, mientras que aquí, la técnica fue la vacunación intradérmica de DNA asistida por electroporación. También, la expresión de otras moléculas de adhesión podrían suplir la falta de CD103 en los linfocitos Trm KO que se forman en piel, como por ejemplo CD49a. CD49a constituye la subunidad α del receptor de integrina $\alpha 1\beta 1$, el cual se une al colágeno IV enriquecido en la membrana basal que separa la epidermis de la dermis y se ha descrito como marcador de los linfocitos Trm (Cheuk y col., 2017).

Ratones transferidos con células OTI KO fueron capaces de generar respuestas secundarias frente a neoantígenos tumorales comparables a las de su contraparte WT, aún luego de la eliminación del compartimento circulante. Considerando que el desafío tumoral se dio durante la semana 8 posterior a la inmunización, se esperaba un menor número de linfocitos Trm en la piel y por ende respuestas secundarias más bajas. No obstante, estas tendieron incluso a ser, en promedio, de mayor magnitud que las generadas por linfocitos OTI WT aunque presentaron una alta dispersión, por lo que las diferencias entre las respuestas secundarias generadas con la estimulación de los neoantígenos tumorales respecto al control sin estimular fueron menos significativas. También se esperaba que, en el grupo con transferencia de linfocitos OTI CD103 KO y

eliminación de la memoria circulante, las respuestas secundarias fueran más bajas que en el grupo con ambos compartimentos de memoria, sin embargo, alcanzaron niveles similares. El déficit en la permanencia que se describe en la literatura para los linfocitos Trm CD103 KO podría ser una explicación para estos resultados. Los linfocitos Trm CD103 KO en piel podrían egresar del tejido tiempo después de la eliminación del compartimento circulante con anti CD45.2 y comportarse como linfocitos T CD8⁺ de memoria circulante, que a su vez podrían favorecer la aparición de respuestas secundarias contra los neoepítomos probados, no obstante hacen falta más estudios para corroborar este mecanismo.

En conjunto, los resultados referidos a experimentos con linfocitos CD103 KO discrepan de lo descrito por otros autores (Mackay y col., 2013) (Park y col., 2018) y, aunque este experimento solo se realizó una vez, sugieren que el modelo CD103 KO no es adecuado para estudiar la deficiencia del compartimento de memoria residente en piel en la respuesta antitumoral, o características del compartimento de memoria circulante en esta respuesta, al menos durante el tiempo que tardaron estos experimentos. De esta manera, no fue posible estudiar la contribución del compartimento circulante en la generación de respuestas secundarias frente a neoantígenos tumorales, aunque nuestros resultados (figura 3c y 5d, izquierda) sugieren una posible contribución en este proceso ya que las respuestas secundarias generadas en los grupos en los que se eliminaba el compartimento circulante tendían a ser levemente menores que los generados en presencia de ambos compartimentos. Una alternativa para poder completar este estudio, podría ser realizar el experimento mostrado en la figura 5, con linfocitos OTI con el gen CD69 interrumpido en lugar de CD103, ya que se ha descrito que la ausencia de CD69 afecta la formación temprana de linfocitos Trm en piel a

diferencia de la ausencia de CD103, que se cree que afecta la permanencia de los linfocitos Trm tiempo después de haberse formado (Mackay y col., 2013).

El siguiente paso en este trabajo fue estudiar la participación de respuestas secundarias del repertorio endógeno de los linfocitos T CD8⁺ en la respuesta antitumoral *in vivo*. A partir de un experimento de redesafío tumoral se demostró que un nuevo tumor puede ser rechazado, aun cuando carece del antígeno que reconocen los linfocitos Trm que mediaron protección en el desafío. Esta protección ocurrió en ausencia de memoria circulante. Por otro lado, los tumores crecieron en ratones no desafiados previamente, indicando que el desafío previo es esencial para proteger en el redesafío. Además, las curvas individuales (fig. 6c) demostraron que no hubo reaparición del tumor MC38 luego de su rechazo, al menos en el intervalo de tiempo estudiado. Estos resultados sugieren la participación de nuevos linfocitos T CD8⁺ capaces de reconocer otros antígenos del tumor, generados producto del rechazo de las células del desafío. Esta hipótesis se ve reafirmada por las respuestas secundarias contra neoantígenos encontradas en los experimentos de estimulación *ex vivo* con los neoepítomos tumorales. De este modo, la generación de respuestas secundarias del repertorio endógeno de los linfocitos T CD8⁺ frente a otros antígenos tumorales es clave en el posterior rechazo de células que carecen del antígeno reconocido inicialmente o de un tumor que reaparece.

Los resultados de este trabajo entregan información relevante en el estudio de vacunas clínicamente aplicables basadas en la formación de linfocitos Trm específicos contra un tumor. A pesar de haber inmunizado contra un péptido presente en el tumor, luego del rechazo se gatillaron respuestas contra otros neoantígenos tumorales. Esto es importante porque una característica de las células tumorales es la acumulación de mutaciones y estas pueden cambiar la estructura proteínica o terminar con la expresión del antígeno

contra el que se inmunizó. De hecho, se han realizado estudios donde se secuencian exones de células tumorales humanas de distintas regiones del tumor y se ha encontrado patrones de mutación diferentes que dan cuenta de la alta heterogenicidad de un tumor (Gerlinger y col., 2012), lo que podría terminar en una expresión diferencial de antígenos. De este modo, dentro del tumor, puede haber células tumorales que no expresan el antígeno contra el cual se inmuniza, no obstante, este trabajo prueba que la muerte de aquellos clones que si lo expresan le permiten al sistema inmune atacar a las células que se escapaban a la inmunización.

Este trabajo entrega evidencia de un nuevo mecanismo por el que los linfocitos Trm y los linfocitos T CD8⁺ del compartimento circulante trabajan en conjunto para otorgar protección antitumoral. En la literatura ya se ha mencionado que la acción coordinada de estos compartimentos es importante para generar una respuesta antitumoral efectiva (Enamorado y col., 2017). En este caso, los resultados muestran un rol importante en la amplitud del repertorio de células T CD8⁺ circulantes contra el tumor. Este mecanismo puede ser importante también en terapias basadas en el bloqueo con anticuerpos de receptores inhibitorios como PD-1 o CTLA-4, ya que se ha descrito que los linfocitos Trm expresan estos receptores (Wakim y col., 2012) (Mackay y col., 2013). De este modo, el desarrollo de terapias enfocadas en el refuerzo de la capacidad de los linfocitos Trm para amplificar el repertorio de linfocitos T CD8⁺ reactivos al tumor, podrían ser de utilidad en la batalla contra el cáncer, en especial, en el control de tumores altamente heterogéneos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron determinar que los linfocitos Trm de la piel de ratón que responden a un tumor, son capaces de generar respuestas secundarias de los linfocitos T CD8⁺ contra neoantígenos derivados de ese tumor. Más aún, son capaces de hacerlo en ausencia del repertorio de memoria circulante y en niveles similares a los generados cuando ambos compartimentos, memoria circulante y residente están presentes.

Los linfocitos T CD8⁺ CD103 KO, son capaces de generar linfocitos Trm en piel en cantidades similares a las generadas con linfocitos T CD8⁺ WT. Estos también presentan la capacidad de potenciar la respuesta antitumoral a través de la amplificación del repertorio de linfocitos T CD8⁺.

Las respuestas secundarias generadas por los linfocitos Trm a través del rechazo de un tumor contribuyen de forma importante en la respuesta antitumoral *in vivo*, siendo capaces de proteger frente a un redesafío tumoral.

En conjunto, los resultados presentados en este trabajo comprueban la capacidad de linfocitos Trm de amplificar la respuesta de linfocitos T CD8⁺ del repertorio endógeno contra neoantígenos derivados del tumor, a través de la eliminación de células tumorales y por ende, confirman la hipótesis planteada.

BIBLIOGRAFÍA

- Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sung, B. & Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical research*, 25(9), 2097-2116. DOI: 10.1007/s11095-008-9661-9.
- Anderson, K. G., Mayer-Barber, K., Sung, H., Beura, L., James, B. R., Taylor, J. J., Qunaj, L., Griffith, T. S., Vezys, V., Barber, D. L. & Masopust, D. (2014). Intravascular staining for discrimination of vascular and tissue leukocytes. *Nature protocols*, 9(1), 209. DOI: 10.1038/nprot.2014.005.
- Ariotti, S., Hogenbirk, M. A., Dijkgraaf, F. E., Visser, L. L., Hoekstra, M. E., Song, J. Y., Jacobs, H., Haanen, J. B. & Schumacher, T. N. (2014). Skin-resident memory CD8+ T cells trigger a state of tissue-wide pathogen alert. *Science*, 346(6205), 101-105. DOI: 10.1126/science.1254803.
- Baaten, B. J., Li, C. R., & Bradley, L. M. (2010). Multifaceted regulation of T cells by CD44. *Communicative & integrative biology*, 3(6), 508-512. DOI: 10.4161/cib.3.6.13495.
- Bankovich, A. J., Shioyama, L. R., & Cyster, J. G. (2010). CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4. *Journal of Biological Chemistry*, 285(29), 22328-22337. DOI: 10.1074/jbc.M110.123299.
- Blanpain, C. (2013). Tracing the cellular origin of cancer. *Nature cell biology*, 15(2), 126. DOI: 10.1038/ncb2657.
- Borst, J., Ahrends, T., Bąbała, N., Melief, C. J. M., & Kastenmüller, W. (2018). CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 18, 635–647. DOI: 10.1038/s41577-018-0044-0.
- Browne, S. K., Roesser, J. R., Zu Zhu, S., & Ginder, G. D. (2006). Differential IFN- γ stimulation of HLA-A gene expression through CRM-1-dependent nuclear RNA export. *The Journal of Immunology*, 177(12), 8612-8619. DOI: 10.4049/jimmunol.177.12.8612.
- Chávez-Galán, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chavez, R., & Lascurain, R. (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cellular & molecular immunology*, 6(1), 15-25. DOI: 10.1038/cmi.2009.3.
- Cheuk, S., Schlums, H., Gallais Sérézal, I., Martini, E., Chiang, S. C., Marquardt, N., Gibbs, A., Detlofsson, E., Introini, A., Forkel, M., Höög, C., Tjernlund, A., Michaëlsson, J., Folkersen, L., Mjösberg, J., Blomqvist, L., Ehrström, M., Stähle, M., Bryceson, Y. T. & Eidsmo, L. (2017). CD49a Expression Defines Tissue-Resident CD8+ T Cells Poised for Cytotoxic Function in Human Skin. *Immunity*, 46(2), 287–300. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.01.009.
- Curtsinger, J. M., & Mescher, M. F. (2010). Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Current opinion in immunology*, 22(3), 333-340. DOI: 10.1016/j.coi.2010.02.013.
- Davis, M. M., & Bjorkman, P. J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *nature*, 334(6181), 395. DOI: 10.1038/334395a0.

Dorner, B. G., Dorner, M. B., Zhou, X., Opitz, C., Mora, A., Güttler, S., Hutloff, A., Mages, H. W., Ranke, K., Schaefer, M., Jack, R. S., Henn, V. & Kroczek, R. A. (2009). Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8⁺ T cells. *Immunity*, 31(5), 823-833. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.08.027.

Durgeau, A., Virk, Y., Corgnac, S., & Mami-Chouaib, F. (2018). Recent advances in targeting CD8 T-cell immunity for more effective cancer immunotherapy. *Frontiers in immunology*, 9, 14. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00014.

Efremova, M., Finotello, F., Rieder, D., & Trajanoski, Z. (2017). Neoantigens generated by individual mutations and their role in cancer immunity and immunotherapy. *Frontiers in immunology*, 8, 1679. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01679.

Enamorado, M., Iborra, S., Priego, E., Cueto, F. J., Quintana, J. A., Martínez-Cano, S., Mejías-Pérez, E., Esteban, M., Melero, I., Hidalgo, A. & Sancho, D. (2017). Enhanced anti-tumour immunity requires the interplay between resident and circulating memory CD8⁺ T cells. *Nature communications*. 8: p. 16073. DOI: 10.1038/ncomms16073.

Farhood, B., Najafi, M., & Mortezaee, K. (2019). CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *Journal of cellular physiology*, 234(6), 8509-8521. DOI: 10.1002/jcp.27782.

Faustino-Rocha, A., Oliveira, P. A., Pinho-Oliveira, J., Teixeira-Guedes, C., Soares-Maia, R., Da Costa, R. G., Colaço, B., Pires, M. J., Colaço, J., Ferreira, R. & Ginja, M. (2013). Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements. *Lab animal*, 42(6), 217. DOI: 10.1038/labam.254.

Gálvez-Cancino, F., López, E., Menares, E., Díaz, X., Flores, C., Cáceres, P., Hidalgo, S., Chovar., O., Alcántara-Hernández, M., Borgna, V., Varas-Godoy, M., Salazar-Onfray, F., Idoyaga, J. & Lladser, A. (2018). Vaccination-induced skin-resident memory CD8⁺ T cells mediate strong protection against cutaneous melanoma. *Oncoimmunology*, 7(7), e1442163. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1442163.

Ganesan, A. P., Clarke, J., Wood, O., Garrido-Martin, E. M., Chee, S. J., Mellows, T., Samaniego-Castruita, D., Singh, D., Seumois, G., Alzetani, A., Woo, E., Friedmann, P. S., King, E. V., Thomas, G. J., Sanchez-Elsner, T., Vijayanand, P. & Ottensmeier, C. H. (2017). Tissue-resident memory features are linked to the magnitude of cytotoxic T cell responses in human lung cancer. *Nature immunology*, 18(8), 940. DOI: 10.1038/ni.3775.

Gauthier, L., Corgnac, S., Boutet, M., Gros, G., Validire, P., Bismuth, G., & Mami-Chouaib, F. (2017). Paxillin binding to the cytoplasmic domain of CD103 promotes cell adhesion and effector functions for CD8⁺ resident memory T cells in tumors. *Cancer research*, 77(24), 7072-7082. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1487.

Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C., & Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual review of immunology*, 20(1), 621-667. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828.

- Gulley, J. L., Madan, R. A., Pachynski, R., Mulders, P., Sheikh, N. A., Trager, J. & Drake, C. G. (2017) Role of Antigen Spread and Distinctive Characteristics of Immunotherapy in Cancer Treatment. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 109, Issue 4. DOI: 10.1093/jnci/djw261.
- Hernandez, C., Huebener, P., & Schwabe, R. F. (2016). Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene*, 35(46), 5931–5941. DOI: 10.1038/onc.2016.104.
- Hewitt E. W. (2003). The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology*, 110(2), 163–169. DOI: 10.1046/j.1365-2567.2003.01738.x.
- Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J., & Carbone, F. R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell*, 76(1), 17-27. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90169-4.
- Houghton, A. N., & Guevara-Patiño, J. A. (2004). Immune recognition of self in immunity against cancer. *The Journal of clinical investigation*, 114(4), 468–471. DOI: 10.1172/JCI22685.
- Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A., & Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*, 12(8), 557. DOI: 10.1038/nri3254.
- Kaech, S. M., Wherry, E. J., & Ahmed, R. (2002). Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature Reviews Immunology*, 2(4), 251. DOI: 10.1038/nri778.
- Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2001). Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell*, 106(3), 263-266. DOI: 10.1016/s0092-8674(01)00455-x.
- Mackay, L. K., Rahimpour, A., Ma, J. Z., Collins, N., Stock, A. T., Hafon, M. L., Vega-Ramos, J., Lauzurica, P., Mueller, S. N., Stefanovic, T., Tschärke, D. C., Heath, W. R., Inouye, M., Carbone, F. R. & Gebhardt, T. (2013). The developmental pathway for CD103+ CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nature immunology*, 14(12), 1294. DOI: 10.1038/ni.2744.
- Maimela, N. R., Liu, S., & Zhang, Y. (2018). Fates of CD8+ T cells in Tumor Microenvironment. *Computational and structural biotechnology journal*. DOI: 10.1016/j.csbj.2018.11.004.
- Mami-Chouaib, F., Blanc, C., Corgnac, S., Hans, S., Malenica, I., Granier, C., Tihy, I. & Tartour, E. (2018). Resident memory T cells, critical components in tumor immunology. *Journal for immunotherapy of cancer*, 6(1), 87. DOI: 10.1186/s40425-018-0399-6.
- Menares. (2019). Amplificación de la respuesta antitumoral mediada por los linfocitos T CD8+ de memoria residente a través de las células dendríticas. (Tesis doctoral). Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile.
- Miller, K. D., Siegel, R. L., Lin, C. C., Mariotto, A. B., Kramer, J. L., Rowland, J. H., Stein, K. D., Alteri, R. & Jemal, A. (2016). Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*, 66(4), 271-289. DOI: 10.3322/caac.21349.
- Ministerio de Salud (MINSAL). 2016. Estrategia Nacional de Cáncer. Chile 2016.

Ministerio de Salud (MINSAL). 2018. Plan Nacional de Cáncer 2018-2028.

Mueller, S. N., Gebhardt, T., Carbone, F. R., & Heath, W. R. (2013). Memory T Cell Subsets, Migration Patterns, and Tissue Residence. *Annual Review of Immunology*, 31(1), 137–161. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032712-095954.

Mueller, S. N., & Mackay, L. K. (2016). Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. *Nature reviews Immunology*, 16(2), 79. DOI: 10.1038/nri.2015.3.

Nizard, M., Roussel, H., Diniz, M. O., Karaki, S., Tran, T., Voron, T., Dransart, E., Sandoval, F., Riquet, M., Rance, B., Marcheteau, E., Fabre, E., Mandavit, M., Terme, M., Blanc, C., Escudie, J. B., Gibault, L., Le Pimpec Barthes, F., Granier, C., Ferreira, L. C. S., Badoual, C., Johannes, L. & Tartour, E.. (2017). Induction of resident memory T cells enhances the efficacy of cancer vaccine. *Nature communications*, 8, 15221. DOI: 10.1038/ncomms15221.

Park, S. L., Buzzai, A., Rautela, J., Hor, J. L., Hochheiser, K., Effern, M., McBain, N., Wagner, T., Edwards, J., McConville, R., Wilmott, J. S., Scolyer, R. A., Tüting, T., Palendira, U., Gyorki, D., Mueller, S. N., Huntington, N. D., Bedoui, S., Hölzel, M., Mackay, L. K., Waithman, J. & Gebhardt, T. (2018). Tissue-resident memory CD8+ T cells promote melanoma–immune equilibrium in skin. *Nature*, 565(7739), 366. DOI: 10.1038/s41586-018-0812-9.

Pecorino, L. (2012). *Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics*. Oxford university press. pp: 6-7.

Pipkin, M. E., Sacks, J. A., Cruz-Guilloty, F., Lichtenheld, M. G., Bevan, M. J., & Rao, A. (2010). Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity*, 32(1), 79-90. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.11.012.

Roos, A. K., Eriksson, F., Walters, D. C., Pisa, P., & King, A. D. (2009). Optimization of skin electroporation in mice to increase tolerability of DNA vaccine delivery to patients. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(9), 1637–1642. DOI: 10.1038/mt.2009.120.

Schenkel, J. M., Fraser, K. A., Vezys, V., & Masopust, D. (2013). Sensing and alarm function of resident memory CD8+ T cells. *Nature immunology*, 14(5), 509. DOI: 10.1038/ni.2568.

Schenkel, J. M., Fraser, K. A., Beura, L. K., Pauken, K. E., Vezys, V., & Masopust, D. (2014). Resident memory CD8 T cells trigger protective innate and adaptive immune responses. *Science*, 346(6205), 98-101. DOI: 10.1126/science.1254536.

Schenkel, J. M., & Masopust, D. (2014). Tissue-Resident Memory T Cells. *Immunity*, 41(6), 886–897. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.12.007.

Schumacher, T. N., & Schreiber, R. D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science*, 348(6230), 69–74. DOI: 10.1126/science.aaa4971.

Shin, H., & Iwasaki, A. (2013). Tissue-resident memory T cells. *Immunological reviews*, 255(1), 165-181. DOI: 10.1111/imr.12087.

Theisen, D., & Murphy, K. (2017). The role of cDC1s in vivo: CD8 T cell priming through cross-presentation. *F1000Research*, 6, 98. DOI: 10.12688/f1000research.9997.1.

Toebes, M., Coccoris, M., Bins, A., Rodenko, B., Gomez, R., Nieuwkoop, N. J., Van de Kastele, W., Rimmelzwaan, G. F., Haanen, J. B., Ovaa, H. & Schumacher, T. N. (2006). Design and use of conditional MHC class I ligands. *Nature medicine*, 12(2), 246. DOI: 10.1038/nm1360.

Topham, D. J., & Reilly, E. C. (2018). Tissue-Resident Memory CD8+ T Cells: From Phenotype to Function. *Frontiers in immunology*, 9, 515. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00515.

Wakim, L. M., Woodward-Davis, A., Liu, R., Hu, Y., Villadangos, J., Smyth, G., & Bevan, M. J. (2012). The molecular signature of tissue resident memory CD8 T cells isolated from the brain. *The Journal of Immunology*, 189(7), 3462-3471. DOI: 10.4049/jimmunol.1201305.

Wang, Z. Q., Milne, K., Derocher, H., Webb, J. R., Nelson, B. H., & Watson, P. H. (2016). CD103 and intratumoral immune response in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 22(24), 6290-6297. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0732.

Webb, J. R., Milne, K., Watson, P., DeLeeuw, R. J., & Nelson, B. H. (2014). Tumor-infiltrating lymphocytes expressing the tissue resident memory marker CD103 are associated with increased survival in high-grade serous ovarian cancer. *Clinical cancer research*, 20(2), 434-444. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1877.

Yadav, M., Jhunjhunwala, S., Phung, Q. T., Lupardus, P., Tanguay, J., Bumbaca, S., Franci, C., Cheung, T. K., Fritsche, J., Weinschenk, T., Modrusan, Z., Mellman, I., Lill, J. R. & Delamarre, L. (2014). Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature*. 515(7528): p. 572-6. DOI: 10.1038/nature14001.

Zhang, N., & Bevan, M. J. (2011). CD8+ T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity*, 35(2), 161-168. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.07.010.