

UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



**EL RÉGIMEN DE LINFODEPLECIÓN CON CICLOFOSFAMIDA
PERJUDICA LA PROTECCIÓN INMUNE ANTITUMORAL A LARGO
PLAZO MEDIADO POR LA TERAPIA CELULAR ADOPTIVA EN UN
MODELO *IN VIVO* DE MELANOMA MURINO**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica Clínica, y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

JUAN PABLO VEGA MEDINA

Directores de Tesis:

Dr. Alvaro Lladser C. y Dr. Vicente Torres G.

Santiago, CHILE

Septiembre 2024

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

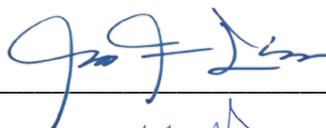
Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

JUAN PABLO VEGA MEDINA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización en Bioquímica Clínica y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día **XX** de diciembre del 2024.

Directores de Tesis:

Dr. Alvaro Lladser C.



Dr. Vicente Torres G.



Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Maritza Garrido P.

Dr. Dante Miranda W.

Dra. Daniela Sauma M.

Agradecimientos

Quiero empezar agradeciendo a Fiorella. Desde que nos conocimos, siempre creíste en mí, haciendo un esfuerzo invaluable por potenciar mis fortalezas y mejorar mis debilidades. Te agradezco por los momentos felices, pero también por los momentos difíciles, cuando me sentía atrapado en un callejón sin salida y tú me tendías la mano para salir juntos. Gracias por los días y noches de estudio, disfrutando de un buen té y de nuestra compañía. Más allá de ser mi pareja, te agradezco por ser mi compañera de estudios, de viajes, de conciertos, de cine, de "carretes" y, sobre todo, de vida. Todo el tiempo que hemos compartido ha forjado en mí un amor incondicional y un lazo tan fuerte que me permite visualizar un futuro claro y hermoso a tu lado. Fio, mi rusia, mi flaca, eres un pilar fundamental en mi vida, y me siento profundamente orgulloso de decir que te amo. Juntos, sé que alcanzaremos todas nuestras metas y superaremos cualquier desafío que se nos presente.

También quiero expresar mi más profundo agradecimiento a toda mi familia, cuyo apoyo incondicional ha sido fundamental para superar este gran desafío. A mi madre, Marisol, siempre con su espíritu artístico, que, sin importar el momento, lograba sacarme una sonrisa y brindarme la energía necesaria para seguir adelante. Gracias por tu compañía, tus sabios consejos y por las "oncesitas" que endulzaban mis noches. Fuiste el motor que me impulsó a ser un mejor profesional, y sin tu ayuda, no habría podido superar los obstáculos de este difícil camino.

A mi padre, mi viejo, Leonel, siempre tan comprometido con el trabajo y la familia. Nunca dejaré de agradecerte por tu apoyo económico y por los grandes valores que me inculcaste: el compromiso, la lealtad, la humildad, la empatía y muchos más. Junto a mi madre, me forjaron los principios que guían mi forma de ser y de pensar. Gracias por tus sabios consejos y tus palabras de aliento: "un buen profesional se hace uno mismo, no la universidad", "mi hijo está en la carrera del futuro", "él está en la búsqueda de una cura para el cáncer". Tu fe en mí fue fundamental para lograr este difícil pero hermoso ciclo de tesis.

También deseo expresar un agradecimiento muy especial a mis hermanos, Mari y Leito, quienes han sido fundamentales en mi crecimiento como persona. El amor y el apoyo que me han brindado son invaluable, no podría haber pedido mejores hermanos mayores que ustedes. Gracias, Leo, por compartir conmigo tus conocimientos en música, matemáticas y estadística; eres un verdadero crack y me siento inmensamente orgulloso de ti. Mi querida hermanita, gracias por todas las experiencias, por tu empatía, por tus maravillosos consejos y por tu constante apoyo durante este

último año. Aún resuena en mi mente: "¡termina la tesis!". Hoy te puedo decir que ya la he terminado, y que gracias a tu ayuda, me he convertido en el profesional que siempre quisiste que fuera.

Gracias a todas las personas de mi familia que, de alguna u otra manera, me apoyaron a lo largo de mi desarrollo profesional: el Edu, el Cabezón, el Andrés, el Ricky, mi tía Paty, mi abuelita Perllí y mi abuelito Ricardo que me cuida desde el cielo. Ya sea con una deliciosa comida, un consejo valioso, un viaje a la estación de metro o simplemente con una sonrisa, su apoyo fue fundamental durante mis años universitarios.

De igual manera, quiero expresar mi agradecimiento a la familia de mi pareja: a Don Renzo, a Claudia y a Giampi, quienes me han recibido con los brazos abiertos y me han brindado su apoyo en innumerables momentos. Muchas gracias por compartir conmigo y sus admirables consejos, los cuales, sin duda, han sido clave para mi crecimiento y madurez. Con ustedes guardo recuerdos entrañables, y su cariño y atención fueron fundamentales en esta etapa de mi vida.

A mis amigos, ustedes han sido un pilar fundamental en mi vida, apoyándome en los momentos más difíciles. En primer lugar, quiero agradecer a mis grandes amigos del "Beast Team": Bodoque, Cami, Ale y Nacho. Gracias por todo su apoyo a lo largo de la universidad. Somos un grupo imparable y, aunque cada uno haya tomado diferentes caminos, el cariño entre nosotros sigue intacto. Volveremos a reunirnos en el futuro cercano. También quiero expresar mi agradecimiento a mis amigos de infancia: Javi, Martín, Cony e Isi. Aunque no estuvieron directamente involucrados en mi etapa universitaria, nuestras experiencias y sus sabios consejos fueron clave en mi desarrollo como persona.

Por último, pero no menos importante, los integrantes del Laboratorio de Inmunoncología. Junto a ellos he crecido profesionalmente estos tres últimos años. Son un excelente grupo de trabajo, he aprendido muchas cosas y hemos disfrutado gratos momentos. Todos me han aportado un granito de arena en mi formación profesional. De forma especial quiero agradecer a Diego, por su increíble apoyo en el desarrollo de mi proyecto de tesis. También a todo el "Team mouse": Eduardo, Barbi, Felipe, Xime, Vicente, Ale y Dani. Gracias por su gran ayuda, hemos superado complejas tareas y es muy grato aprender juntos. También a Alvaro Lladser, el líder del equipo, por la oportunidad de desarrollarme en el laboratorio y su orientación en el quehacer científico.

Financiamiento

Esta tesis fue financiada por fondos del proyecto Basal FB210008 de la Fundación Ciencia & Vida y el proyecto FONDECYT N° 1212070, cuyo investigador responsable es Alvaro Lladser Caldera y se titula “Unveiling the cross-talk between CD8 T cells and dendritic cells underlying effective and long-lasting antitumor immunity”.

Presentaciones a congresos

Vega-Medina J, Figueroa D, Hoffman-Vega F, Roa E, Borgna V, Lladser A. Generación de una nueva línea celular de melanoma murino para evaluar la respuesta antitumoral contra neoantígenos en un modelo de terapia celular adoptiva. XXXVIII Congreso Nacional de Estudiantes de Bioquímica y Carreras Afines. Agosto, 01-05, 2022. Valdivia, Chile. Póster. (Segundo premio a la mejor comunicación en formato póster en la categoría pregrado/magíster).

Vega-Medina J, Figueroa D, Ardiles F, Borgna V, Lladser A. Lymphodepleting preconditioning regimen with cyclophosphamide abrogates long-term protection of adoptive cell therapy against solid tumors. XXXV Reunión Anual de la Sociedad de Biología Celular de Chile. Noviembre, 06-10, 2023. Puerto Varas, Chile. Póster.

Vega-Medina J, Figueroa D, Ardiles F, Hernández-Oliveras A, Gálvez-Cancino F, Flores F, Hidalgo S, López X, Gonzales H, Osorio F, Borgna V, Lladser A. Long-term efficacy of adoptive cell therapy is determined by host antitumor CD8⁺ T cell immunity and undermined by lymphodepleting preconditioning. IMPACT Cell and Gene Therapy Meeting. Marzo, 21-22, 2024. Santiago, Chile. Presentación Oral.

Vega-Medina J, Figueroa D, Ardiles F, Hernández-Oliveras A, Gálvez-Cancino F, Flores F, Hidalgo S, López X, Gonzales H, Osorio F, Borgna V, Lladser A. Lymphodepleting preconditioning impairs long-term host antitumor T cell immunity induced by adoptive cell therapy. 14th Latin American and Caribbean Immunology Congress. Noviembre, 4-8, 2024. Buenos Aires, Argentina. Póster.

Publicaciones científicas

Figueroa, D., **Vega-Medina, J.**, Hernández-Oliveras, A., Gálvez-Cancino, F., Ardiles, F., Flores, F., Hidalgo, S., López, X., González, H., Osorio, F., Borgna, V., Lladser, A. (2024). Long-term efficacy of adoptive cell therapy is determined by host CD8⁺ T cells and undermined by lymphodepleting preconditioning. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.05.16.594554>.

ÍNDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
FINANCIAMIENTO	v
PRESENTACIONES A CONGRESOS Y PUBLICACIONES CIENTÍFICAS	vi
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
1. Introducción	01
2. Hipótesis	12
3. Objetivo general	12
4. Objetivos específicos	12
5. Materiales	13
6. Metodología	15
7. Resultados	20
8. Discusión	34
9. Conclusiones	40
10. Referencias	41

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Establecimiento de la respuesta inmune antitumoral.	4
Figura 2 Linfocitos T CD8 ⁺ exhaustos.	7
Figura 3 Diferentes estrategias de terapia celular adoptiva.	9
Figura 4 El régimen de linfodepleción con ciclofosfamida elimina a las subpoblaciones de linfocitos T CD8 ⁺ reactivas contra el tumor y cDC1 intratumorales.	21
Figura 5 El régimen de linfodepleción con ciclofosfamida elimina los linfocitos T CD8 ⁺ endógenos y cDC1 migratorias en dLN.	24
Figura 6 El régimen de linfodepleción con ciclofosfamida elimina los linfocitos T CD8 ⁺ endógenos e induce la expansión de los linfocitos OTI transferidos en sangre periférica.	26
Figura 7 La ACT aumenta la infiltración intratumoral de los linfocitos T CD8 ⁺ endógenos y el régimen de linfodepleción con ciclofosfamida aumenta la infiltración intratumoral de los linfocitos OTI transferidos.	28
Figura 8 La ACT produce una regresión tumoral completa y una ACT subóptima la regresión parcial de tumores de melanoma murino.	29
Figura 9 El régimen de linfodepleción con ciclofosfamida aumenta la eficacia antitumoral de una ACT subóptima en tumores sólidos.	31
Figura 10 La ACT eficaz genera una protección inmune antitumoral a largo plazo, pero esta se ve abolida por el régimen de linfodepleción con ciclofosfamida.	33

ABREVIATURAS

ACT	: Adoptive cell therapy / Terapia celular adoptiva
ADN	: Ácido desoxirribonucleico
APC	: Allophycocyanin / Aloficocianina
APCs	: Antigen presenting cells / Células presentadoras de antígenos
APC/Cy7	: Allophycocyanin-Cyanine 7 / Aloficocianina-cianina 7
CAR-T	: chimeric antigen receptor therapy / Terapia con receptor de antígeno quimérico
CD	: Cluster of differentiation / Cúmulo de diferenciación
cDC1	: Conventional type 1 dendritic cells / Células dendríticas convencionales de tipo 1
CO₂	: Dióxido de carbono
CTLA-4	: Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 / Antígeno 4 del linfocito T citotóxico
CTLs	: Cytotoxic CD8 ⁺ T cells / Linfocitos T CD8 ⁺ citotóxicos
CXCL9/10	: C-X-C Chemokine Ligand 9/10 / Ligando de quimioquina CXC tipo 9/10
CXCR3	: C-X-C Chemokine Receptor 3 / Receptor de quimioquina CXC tipo 3
Cy	: Cyclophosphamide / Ciclofosfamida
DC	: Dendritic cells / Células dendríticas
dLN	: Tumor-draining lymph node / Nódulo linfático drenante de tumor
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid / Ácido etilendiaminotetraacético
FITC	: Fluorescein isothiocyanate / Isotiocianato de fluoresceína
HBSS	: Hanks' balanced salt solution / Solución balanceada de Hank
IFN-γ	: Interferon gamma / Interferón gamma
IL	: Interleukin / Interleuquina

LAG-3	: Lymphocyte-activation gene 3 / Gen de activación de linfocitos 3
MHC-I	: Major histocompatibility complex class I / Complejo principal de histocompatibilidad de clase I
PBS	: Phosphate buffered saline / Tampón fosfato salino
PD-1	: Programmed cell death protein 1 / Proteína de muerte celular programada 1
PD-L1	: Programmed cell death-ligand 1 / Ligando 1 de muerte celular programada 1
PE	: Phycoerythrin / Ficoeritrina
PerCP	: Peridinin-Chlorophyll-Protein / Proteína de clorofila-peridina
PE/Cy7	: Phycoerythrin-cyanine 7 / Ficoeritrina-cianina 7
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
TCF-1	: T cell factor 1 / Factor 1 de células T
TCR	: T cell receptor / Receptor de células T
T_{diff}	: Terminally differentiated T cells / Linfocitos T CD8 ⁺ terminalmente diferenciados
T_{em}	: Effector memory T cells / Linfocitos T CD8 ⁺ de memoria efectora
TGF-β	: Transforming growth factor beta / Factor de crecimiento transformante beta
TILs	: Tumor infiltrating lymphocytes / Linfocitos infiltrantes de tumor
TME	: Tumor microenvironment / Microambiente tumoral
TNF-α	: Tumor necrosis factor alfa / Factor de necrosis tumoral alfa
TOX	: Thymocyte Selection Associated High Mobility Group Box
T_{pex}	: Progenitor exhausted T cells / Linfocitos T CD8 ⁺ progenitores exhaustos
T_{rm}	: Tissue-resident memory T cells / Linfocitos T de memoria residente de tejido

RESUMEN

El cáncer se caracteriza por la división celular descontrolada y diseminación a otros tejidos, y este se ha transformado en la principal causa de muerte a nivel mundial. En Chile se diagnosticaron 54.000 casos de cáncer, junto con una mortalidad de más de 28.000 personas durante el año 2020, posicionando a esta enfermedad en un problema de salud pública nacional. El melanoma resulta de la proliferación descontrolada de melanocitos ubicados en el estrato basal de la piel y una vez que el melanoma se vuelve metastásico, el pronóstico de los pacientes es muy desfavorable. Dentro de las terapias disponibles, la inmunoterapia ha sido muy prometedora.

Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs) son importantes para una respuesta inmune efectiva contra el cáncer. Las células dendríticas activan a los linfocitos T CD8⁺ vírgenes a través de la presentación antigénica y, en consecuencia, estos se diferencian a CTLs. Posteriormente, estos son capaces de migrar a otros tejidos, reconocer y eliminar a células tumorales a través de la liberación de perforinas y granzimas o la secreción de citoquinas como TNF- α e IFN- γ , que median la actividad antitumoral. Sin embargo, la expresión de receptores inhibitorios como PD-1 limita la actividad citotóxica de los CTLs a través de la interacción con su proteína ligando PD-L1. Además, la estimulación crónica del receptor de célula T (TCR) produce un perfil de agotamiento en los CTLs. A pesar de esto, recientemente se ha encontrado un estado más progenitor, que se caracteriza por la expresión del factor de transcripción TCF-1 y se ha denominado linfocitos T CD8⁺ progenitores exhaustos (T_{pex}). Luego, estos pueden diferenciarse a linfocitos T CD8⁺ terminalmente diferenciados (T_{diff}), que median una respuesta antitumoral aguda. En conjunto, ambas poblaciones entregan una respuesta antitumoral efectiva y duradera.

La terapia celular adoptiva (ACT) consiste en la transfusión autóloga de linfocitos T previamente activados *in vitro* que presentan reactividad antitumoral. Esta ha demostrado una eficacia notable en cánceres hematológicos, sin embargo, en tumores sólidos, hay un gran porcentaje de pacientes que no responden a la terapia. Por esta razón, una estrategia que se utiliza regularmente en la clínica es un régimen de linfodepleción previo a la ACT. La ciclofosfamida (Cy) es una droga quimioterapéutica que provoca la apoptosis

de células altamente proliferativas y se utiliza como agente linfodepletante. Sin embargo, esta puede tener un efecto perjudicial en los pacientes y en su sistema inmune endógeno.

Por esta razón, esta tesis buscó explorar el efecto de un régimen de linfodepleción con Cy sobre las células inmune endógenas, las células transferidas y la eficacia de la ACT. Para esto, se utilizó un modelo de melanoma murino el cual recibió un régimen de linfodepleción con Cy y se determinó su impacto sobre las células inmunes a través de citometría de flujo. Añadido a esto, se evaluó la eficacia de la ACT a través de curvas de crecimiento tumoral y análisis de supervivencia.

El régimen de linfodepleción con Cy elimina a linfocitos T CD8⁺ y células dendríticas convencionales de tipo 1 (cDC1), tanto en tumor como en nódulo drenante de tumor (dLN). Además, los linfocitos T CD8⁺ que logran infiltrar en el tumor no adquieren un perfil reactivo contra el tumor T_{pex} o T_{diff}. Por otro lado, una ACT eficaz aumenta los linfocitos T CD8⁺ endógenos intratumorales, en cambio, el régimen de linfodepleción con Cy elimina a los linfocitos T CD8⁺ endógenos e induce la expansión de los linfocitos transferidos, tanto en sangre periférica como en el tumor. En consecuencia, el régimen de linfodepleción con Cy mejora la eficacia de una ACT subóptima, no obstante, ante un redesarío tumoral con una mutante de escape antigénica, se pierde la protección inmune antitumoral a largo plazo otorgada por una ACT eficaz.

Estos resultados demuestran el doble rol del régimen de linfodepleción con Cy, el cual favorece la expansión de las células transferidas y el rechazo tumores primarios, pero perjudica la inmunidad antitumoral a largo plazo, lo que en última instancia puede favorecer la resistencia a la ACT.

ABSTRACT

Cancer is characterized by uncontrolled cell division and dissemination to other tissues. Unfortunately, it has become the leading cause of death worldwide. In Chile, 54,000 cases of cancer were diagnosed along with a mortality of more than 28,000 people during 2020, making this disease a national public health problem. Melanoma results from the uncontrolled proliferation of melanocytes located in the basal layer of the skin and once melanoma becomes metastatic, the prognosis for patients is very poor. Among the available therapies, immunotherapies have shown great promise.

Cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes (CTLs) are important for an effective immune response against cancer. Dendritic cells activate naive CD8⁺ T lymphocytes through antigen presentation and consequently they differentiate into CTLs. Subsequently, CTLs can migrate to peripheral tissues, recognize and eliminate tumor cells by producing perforins and granzymes or secreting cytokines such as TNF- α and IFN- γ , which mediate antitumor activity. However, the expression of inhibitory receptors such as PD-1 limits the cytotoxic activity of CTLs through interaction with their ligand PD-L1. Furthermore, chronic activation of the T cell receptor (TCR) leads to an exhaustion profile of CTLs. However, a progenitor state characterized by the expression of the transcription factor TCF-1 has recently been identified and named exhausted progenitor CD8⁺ T cells (T_{pex}). They then differentiate into terminally differentiated CD8⁺ T cells (T_{diff}) that mediate an acute antitumor response. Together, both populations provide an effective and long-lasting antitumor response.

Adoptive cell therapy (ACT) consists of the autologous transfusion of previously *in vitro* activated T lymphocytes with antitumor reactivity. It has shown remarkable efficacy in hematological cancers, but in solid tumors there is a large percentage of patients who do not respond to ACT. For this reason, a strategy often used in the clinic is the lymphodepletion regimen prior to ACT. Cyclophosphamide (Cy) is a chemotherapeutic drug that induces apoptosis of highly proliferative cells and is used as a lymphodepleting agent. However, it can have a detrimental effect on patients and their endogenous immune system.

Therefore, this study explore the effect of a lymphodepletion regimen with Cy on endogenous immune cells, transferred cells and the efficacy of ACT. For this purpose, a murine melanoma model was used that received a lymphodepletion regimen with Cy, and the effect on immune cells was determined by flow cytometry. In addition, the efficacy of ACT was assessed by tumor growth curves and survival analysis.

The lymphodepletion regimen with Cy eliminates CD8⁺ T lymphocytes and type-I conventional dendritic cells (cDC1), both in the tumor and in the tumor-draining lymph node (dLN). Moreover, CD8⁺ T lymphocytes infiltrating the tumor do not acquire a tumor-reactive profile assessed as T_{pex} or T_{diff} phenotypes. On the other hand, an effective ACT increases intratumoral endogenous CD8⁺ T lymphocytes, whereas the lymphodepletion regimen with Cy eliminates endogenous CD8⁺ T lymphocytes and induces the expansion of the transferred lymphocytes, both in the peripheral blood and in the tumor. Finally, although the lymphodepletion regimen with Cy improves the efficacy of suboptimal ACT, the long-term antitumor immune protection afforded by effective ACT is lost.

These results demonstrate the dual role of the Cy, which promotes the expansion of transferred cells and primary tumor rejection, but impairs long-term antitumor immunity, which may ultimately promote resistance to ACT.

1. INTRODUCCIÓN

Generalidades sobre el cáncer y el melanoma

El cáncer es un concepto que se ha denominado a varias enfermedades que comparten un factor común: división celular descontrolada y diseminación a otras partes del cuerpo, causado por una desregulación del proceso celular normal de proliferación celular (Hanahan & Weinberg, 2011). Durante los últimos 20 años, el cáncer se ha transformado en una de las principales causas de muerte a nivel mundial, llegando a cifras de 18,1 millones de personas diagnosticadas y 9,6 millones de muertes hasta el año 2018 (Bray et al, 2018). Chile no es la excepción, según los datos epidemiológicos del Global Cancer Observatory se diagnosticaron más de 54.000 casos de cáncer, junto con una mortalidad de más de 28.000 personas durante el año 2020 (Parra et al, 2020). Además, un informe de vigilancia realizado por el Departamento de Epidemiología del Ministerio de Salud de Chile demuestra que, entre los años 2009 y 2018, la tasa de mortalidad por tumores supera la tasa de mortalidad por enfermedades del sistema circulatorio (Ministerio de Salud, 2020), situando a esta patología como un importante asunto de salud nacional.

El melanoma corresponde a una neoplasia cutánea que resulta de la transformación y proliferación descontrolada de melanocitos ubicados en el estrato basal de la piel (Miller & Mihm, 2006). Se han descrito 4 subtipos de melanoma: (1) melanoma de extensión superficial, (2) melanoma lentigo maligno, (3) melanoma lentiginoso acral y (4) melanoma nodular. El melanoma de extensión superficial se caracteriza por ser una lesión pequeña de color marrón que crece lentamente de manera radial, el cual da cuenta del 70% de los casos de melanoma aproximadamente (Bologna, Jorizzo & Schaffer, 2012). Además, se encuentra típicamente en el torso ya que se relaciona con la exposición excesiva a radiación UV y es el más prevalente en pacientes menores de 40 años. Por otro lado, el melanoma lentigo maligno usualmente se desarrolla en pacientes mayores con la piel dañada por una continua exposición a la radiación UV en la cara, orejas o cuello (McKenna et al, 2006). El tercer subtipo es la forma más rara de melanoma, se presenta como una mancha oscura en la planta del pie o en la palma de la

mano y no está asociado con la exposición a radiación UV (Goydos & Shoen, 2016). Por último, el melanoma nodular se considera como el más agresivo debido a su rápido crecimiento y este corresponde al 15% de los melanomas (Menzies et al, 2013).

Esta enfermedad afecta principalmente a caucásicos de ambos sexos, y una vez que el melanoma se vuelve metastásico, el pronóstico es bastante desfavorable (Berwick et al., 2015). Existen varias terapias disponibles para el tratamiento del melanoma, y dependiendo de las características del tumor (ubicación, estadio y perfil genético), se escogerá la mejor opción terapéutica para los pacientes. Dentro de estas terapias se encuentran la resección quirúrgica del tumor con o sin tratamiento ganglionar, quimioterapia, inhibidores de transducción de señales y, finalmente, inmunoterapias, de la cual hablaremos en más profundidad (Corrie et al, 2014).

Inmunología del cáncer

Se han descrito varios procesos inter y extracelulares (conocidos como “hallmarks”) por los cuales el cáncer puede desarrollarse y progresar, como por ejemplo una proliferación sostenida, la evasión de supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, angiogénesis, metástasis, reprogramación metabólica y evasión del sistema inmune (Hanahan & Weinberg, 2011). La evasión del sistema inmune se ha estudiado durante varias décadas. El primer estudio que describe una relación entre los tumores malignos y el sistema inmune se sitúa en el siglo XIX (Coley, 1893). En 1909, Paul Ehrlich describió la importante función del sistema inmune para proteger al hospedero del cáncer. A mediados del siglo XX, Burnet y Thomas postularon el concepto de vigilancia inmunológica, sugiriendo que los linfocitos son los responsables de identificar y eliminar células que contienen mutaciones y difieren de células normales (Kim, Emi & Tanabe, 2007). Hoy en día es bien conocido que las células tumorales pueden ser y son reconocidas por el sistema inmune debido a los cambios bioquímicos que ocurren en las células tumorales en comparación con las células normales.

Existe un período dinámico, conocido como inmunoedición tumoral, que consiste en la destrucción del tumor por las células inmunes, pero, eventualmente, las células tumorales a través de varios mecanismos son capaces de evadir el sistema de eliminación inmune (Block & Markovic, 2009). La teoría de la inmunoedición se compone de tres fases. En la primera fase las células malignas pueden ser identificadas y eliminadas por el sistema inmunitario a través de la inmunovigilancia (Olszanski, 2015). En esta etapa participa la inmunidad innata, seguido de la presentación de antígenos tumorales por parte de las células dendríticas, desencadenando el desarrollo de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicos que permiten la destrucción del tumor. En otras palabras, ocurre el proceso denominado “inmunovigilancia”, y sumado a esto, se ha considerado que esta fase podría corresponder al desarrollo temprano del tumor. Posteriormente, en la segunda fase, hay un equilibrio en donde las células tumorales que no fueron eliminadas no son capaces de crecer. Se cree que este proceso puede ser el más largo, el cual puede durar años (Gasparri et al, 2017). Finalmente, la tercera fase corresponde a la evasión inmune, donde las células tumorales pueden crecer y metastatizar debido a una pérdida de control y eliminación por parte de las células del sistema inmune. Múltiples mecanismos permiten a las células malignas evadir el sistema inmune, los cuales pueden ser porque las mismas células tumorales suprimen a las células inmunes o por adquisiciones genéticas que llevan a la supresión inmunitaria (Oiseth & Aziz, 2017).

Linfocitos T CD8⁺ citotóxicos

Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs) son parte del sistema inmune adaptativo y son cruciales para mediar una respuesta inmune efectiva, tanto para infecciones virales como para el cáncer. Las respuestas de los CTLs comienzan en los órganos linfoides secundarios, donde las células dendríticas (DCs), que llevan antígenos derivados de células tumorales o virus, activan linfocitos T CD8⁺ vírgenes (**Figura 1**) (Broz et al, 2014). Para que los linfocitos T CD8⁺ vírgenes puedan ser activados, debe ocurrir un proceso conocido como presentación antigénica. Para iniciar este proceso, células dendríticas convencionales de tipo 1 (cDC1) deben presentar antígenos provenientes de péptidos (con un largo de 8 a 10 aminoácidos) en un contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de tipo I (MHC-I), junto con otras señales como moléculas coestimuladoras (por ejemplo, CD80 y CD86) y citoquinas (por ejemplo, IL-12) (Maier et al, 2020). Producto de la presentación antigénica, varios clones de linfocitos T CD8⁺ que

contienen un receptor de célula T (TCR) específico para un complejo de péptido/MHC-I, proliferan a gran escala y se diferencian a CTLs. Posteriormente, los CTLs específicos para antígenos tumorales son capaces de migrar a los tejidos periféricos y destruir a las células tumorales a través de mecanismos citotóxicos, como la liberación de gránulos que contienen perforinas y granzimas o también la inducción de apoptosis mediada por FasL/FAS (Russell, 2002). Además, la actividad citotóxica se acompaña de la secreción de citoquinas efectoras como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interferón γ (IFN- γ), las cuales promueven la presentación antigénica de las células tumorales, inducen la apoptosis y activan a otras células inmunes, como los macrófagos y DCs (Schenkel, 2014). Sumado a esto, se ha reportado que la producción de citoquinas efectoras es crítica para obtener una respuesta antitumoral efectiva, ya que estas podrían promover la producción de quimioquinas que reclutan linfocitos T, como CXCL9 o CXCL10 vía CXCR3, en distintas células dentro del microambiente tumoral (TME) (Maurice, 2019).

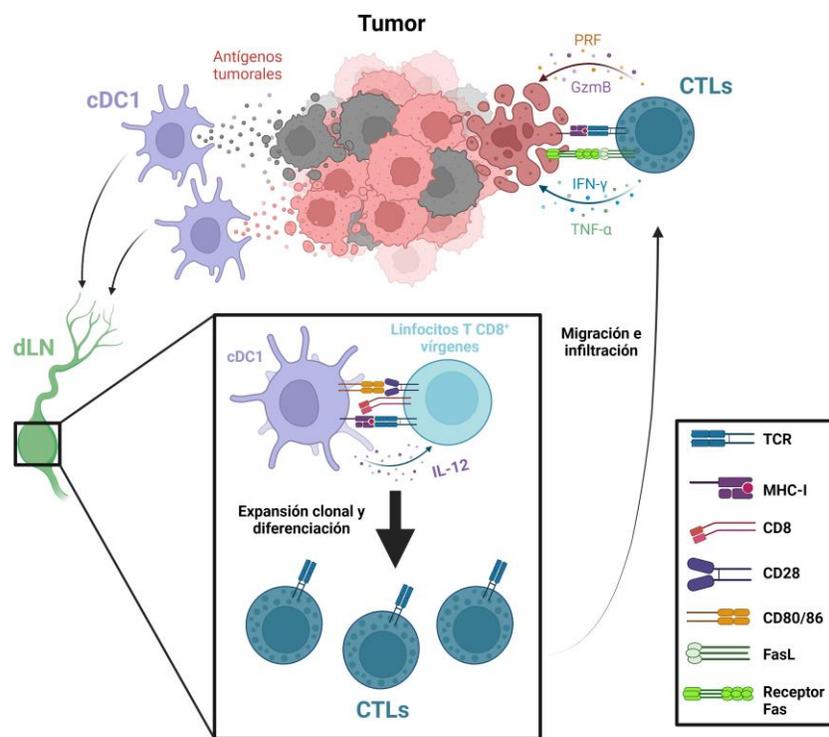


Figura 1: Establecimiento de la respuesta inmune antitumoral. Primero, las cDC1 capturan antígenos tumorales a través de fagocitosis o macropinocitosis. Luego de su respectiva maduración, estos migran al dLN y presentan los antígenos tumorales a linfocitos T CD8+ vírgenes. Para una correcta presentación antigénica se requieren de 3 señales, el reconocimiento del complejo MHC-I/antígeno por parte del TCR, la coestimulación como la interacción entre CD80/86

con CD28 y, por último, la secreción de citoquinas como IL-12. Esto desencadena una expansión clonal y diferenciación a CTLs. Finalmente, los CTLs tienen la capacidad de migrar hacia tejidos periféricos, reconocer células tumorales y ejercer su acción citotóxica a través de la secreción de moléculas como PRF y GzmB, la secreción de citoquinas proinflamatorias como IFN- γ y TNF- α , y la inducción de apoptosis mediada por la interacción entre el receptor FAS con FasL. cDC1: células dendríticas convencionales de tipo 1; dLN: nódulo linfático drenante de tumor; CTLs: linfocitos T CD8⁺ citotóxicos; PRF: perforina; GzmB: granzima B; TCR: receptor de célula T; MHC-I: complejo principal de histocompatibilidad I. Figura creada en BioRender.

Los antígenos que son reconocidos por CTLs se pueden clasificar en dos grupos, los autoantígenos asociados a tumor y neoantígenos. Los autoantígenos asociados a tumor provienen de proteínas que aumentan su expresión en células tumorales, pero también se pueden expresar en diferentes niveles en células normales. Al contrario, los neoantígenos provienen de proteínas que sufrieron mutaciones somáticas (como inserciones, deleciones, etc), y como resultado, contienen un aminoácido distinto al de la proteína silvestre (Rooney et al, 2015). La respuesta generada contra autoantígenos es sometida a una selección negativa durante su desarrollo en el timo, la cual elimina linfocitos T potencialmente autorreactivos (Slansky et al, 2000). En cambio, la respuesta contra neoantígenos no es sometida al mecanismo de tolerancia central, por lo que estos linfocitos T pueden contener TCRs de alta afinidad con el potencial de mediar una inmunidad antitumoral eficaz (Sim et al, 2020).

Progresión tumoral y agotamiento de linfocitos T

A pesar de que el sistema inmune puede montar una respuesta antitumoral, la mayoría de los tumores clínicamente observables escapan del control inmune a través de varios mecanismos, resultando en una progresión tumoral, metástasis, y eventualmente la muerte del paciente. Esta adaptación por parte de las células tumorales se produce por una combinación de cambios genotípicos y fenotípicos en respuesta a la presión ejercida por el sistema inmune o por la terapia antitumoral, como lo es la radioterapia o quimioterapia. Por tanto, las células tumorales seleccionadas persisten y forman una masa tumoral heterogénea caracterizada por la presencia de mutantes que pierden antígenos, expresan ligandos de receptores inhibitorios y tienen un estado prometastásico (Dunn, Old & Schreiber, 2004).

La expresión de receptores inhibitorios, como la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1), es uno de los principales mecanismos que limitan la actividad citotóxica de los CTLs a través de la interacción con su proteína ligando de muerte programada 1 (PD-L1), la cual aumenta su expresión en células tumorales y células mieloides supresoras en respuesta a citoquinas efectoras secretadas por los CTLs, como IFN- γ (Lau et al, 2017). Además, la expresión de PD-1 es característico de los CTLs reactivos contra tumor (Gros et al, 2014). A medida que va progresando el tumor, el TME se convierte en un estado inmunosupresor, debido a el reclutamiento de linfocitos T reguladores, células mieloides supresoras y la secreción de citoquinas anti-inflamatorias como lo son la IL-10 y el factor TGF- β (Vinay et al, 2015). El TME se transforma en un ambiente hostil para los CTLs reactivos contra tumor, y junto con la continua exposición a antígenos tumorales y activación crónica del TCR, estos adquieren un perfil exhausto o disfuncional (Tex) (Sharpe & Pauken, 2018). Las células Tex se caracterizan por tener una alta expresión de varios receptores inhibitorios, como PD-1, TIM-3 y LAG-3, lo cual limita su capacidad proliferativa y su función citotóxica. Este perfil exhausto se presenta como un programa transcripcional y epigenético diferencial que es principalmente regulado por el factor de transcripción TOX, el cual es crítico en la inducción de este estado celular (Yao et al, 2019; Scott et al, 2019).

A pesar de este hallazgo desfavorable para la inmunidad antitumoral, evidencia reciente ha demostrado que existen subtipos de células Tex (**Figura 2**), dentro de los cuales se encuentra un estado menos diferenciado de CTLs reactivos contra el tumor que tiene características de una célula progenitora, denominado linfocitos T CD8⁺ progenitores exhaustos (T_{pex}). Estos persisten en el tiempo y tienen la capacidad de autorrenovarse debido a la expresión del factor de transcripción TCF-1. Luego, los T_{pex} se pueden diferenciar a linfocitos T CD8⁺ terminalmente diferenciados (T_{diff}), que son altamente citotóxicos y proveen una función antitumoral aguda (Miller et al, 2019). Ambas subpoblaciones de CTLs reactivos contra el tumor se pueden identificar por la expresión de PD-1, y en conjunto pueden entregar una respuesta antitumoral a largo plazo, por lo cual su estudio se ha convertido extremadamente relevante en el campo de las inmunoterapias contra el cáncer (Kallies, Zehn & Utzschneider, 2020).

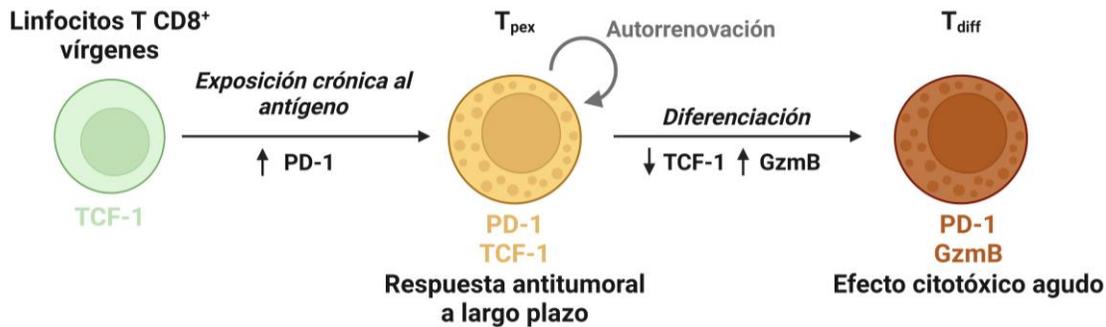


Figura 2: Linfocitos T CD8⁺ exhaustos. Los linfocitos T CD8⁺ vírgenes adquieren un perfil exhausto debido a la exposición crónica al antígeno, provocando su diferenciación a linfocitos T_{pex}, que se caracterizan por la coexpresión de PD-1 y TCF-1. Estos tienen características de células troncales y tienen la capacidad de autorrenovarse, por lo que se han asociado a una respuesta antitumoral a largo plazo. Posteriormente, estos se diferencian a linfocitos T_{diff}, los cuales pierden la expresión de TCF-1 y aumentan la expresión de GzmB, por lo que median una respuesta antitumoral citotóxica aguda. TCF-1: factor 1 de células T; PD-1: proteína de muerte celular programada 1; T_{pex}: linfocitos T CD8⁺ progenitores exhaustos; T_{diff}: linfocitos T CD8⁺ terminalmente diferenciados; GzmB: granzima B. Figura creada en BioRender.

Immunoterapias en melanoma y otras neoplasias malignas

Las inmunoterapias, utilizadas para combatir el cáncer, tienen como objetivo restaurar o aumentar la actividad antitumoral de los CTLs específicos contra antígenos tumorales para destruir el tumor. La expresión de receptores inhibitorios, específicamente PD-1 y la proteína asociada a linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA-4), representan mecanismos de regulación claves que limitan la actividad de los CTLs, como se describió en el punto anterior. Por esta razón, se han desarrollado terapias que tienen como objetivo bloquear los receptores inhibitorios, que se conocen como inhibidores de puntos de control inmunes (en inglés, *immune checkpoints inhibitors*). Estos consisten en anticuerpos monoclonales que bloquean los receptores inhibitorios de los linfocitos T, y han demostrado una eficacia clínica notable en pacientes con melanoma metastásico, como también en cáncer de pulmón, cáncer renal, cáncer de hígado y otros (Hodi et al, 2010; Garon et al, 2015). Actualmente existen fármacos comerciales basados en anticuerpos, como ipilimumab, que tiene como objetivo bloquear el receptor inhibitorio CTLA-4 (Eggermont et al, 2016). Cabe destacar que el uso combinado de anticuerpos que bloquean receptores inhibitorios, como PD-1 y CTLA-4, ha resultado en respuestas

clínicas impresionantes en pacientes con melanoma (Wolchok et al, 2017). Además, se ha reportado que la eficacia de inhibidores de PD-1 en pacientes con melanoma se encuentra asociado a la presencia de neoantígenos tumorales (Rizvi et al, 2015) y, por otro lado, con una infiltración de linfocitos T de memoria residente de tejido (T_{rm}) (Edwards et al, 2018). El mecanismo de acción por el cual actúan los inhibidores de PD-1 es aumentando la actividad antitumoral de linfocitos T_{pex} (Siddiqui et al, 2019) y promoviendo la infiltración de nuevos clones de linfocitos T $CD8^+$ endógenos que contribuyen al repertorio de TCRs que se encuentran en el tumor, es decir, son más diversos y aumentan la policlonalidad (Yost et al, 2019).

La terapia celular adoptiva (ACT, del inglés *adoptive cell therapy*), que consiste en la transfusión autóloga de linfocitos T activados *in vitro* que presentan reactividad antitumoral, ha demostrado ser una estrategia terapéutica con una eficacia clínica relevante. Existen actualmente tres tipos de ACT (**Figura 3**) que se han descrito ampliamente en la literatura: la terapia génica con TCR, los linfocitos T modificados con el receptor de antígeno quimérico (CAR-T) y los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) (June et al, 2015). En las primeras dos, que corresponden a terapias con linfocitos T modificados genéticamente, los linfocitos T de sangre periférica se aíslan mediante leucoféresis, se activan y se transducen a través del uso de vectores virales para expresar un TCR o CAR específico contra un antígeno tumoral (Rohaan et al, 2019). Mientras que la terapia génica con TCR ha demostrado resultados prometedores en paciente con melanoma y otros tumores sólidos (Johnson et al, 2009), la terapia CAR-T ha demostrado un éxito notable en pacientes con cánceres hematológicos, como leucemia, linfoma y mieloma (Porter et al, 2011; Kochenderfer et al, 2017; Garfall et al, 2015). Por otro lado, la ACT con TILs consiste en la expansión y activación *ex vivo* de TILs después de la resección quirúrgica del tumor y, posteriormente, se realiza la transferencia adoptiva al paciente (Andersen et al, 2016). En tumores sólidos, la administración de TILs ha mostrado buen potencial terapéutico en pacientes con melanoma y otros tipos de cáncer (Prickett et al, 2016; Stevanović et al. 2019).

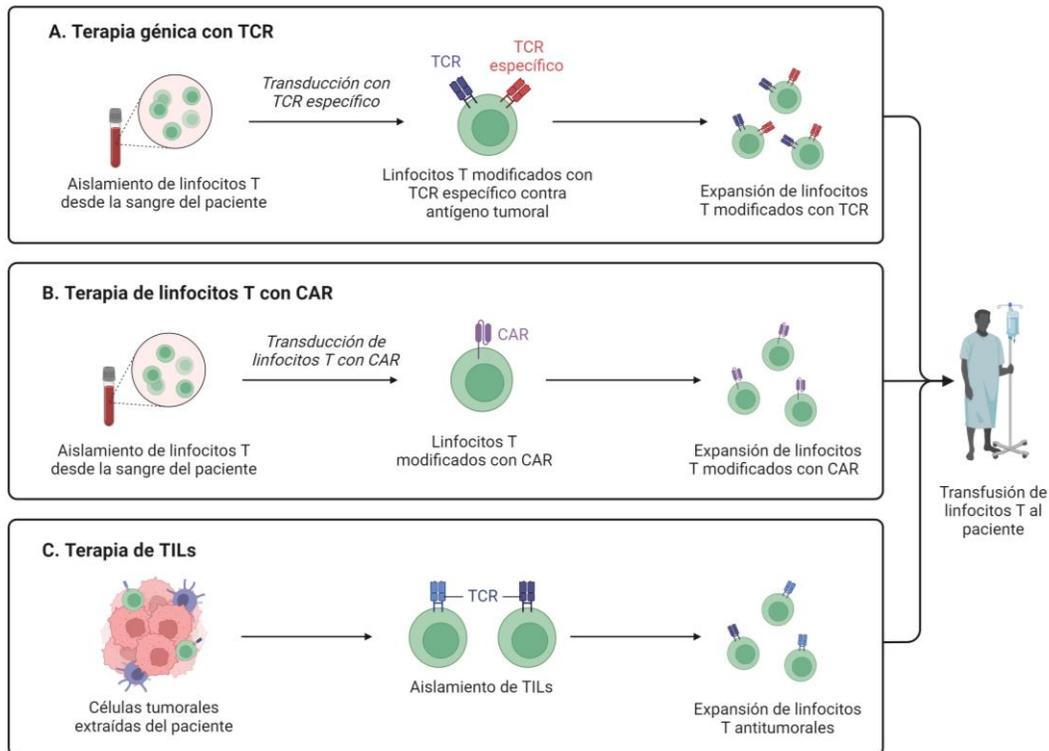


Figura 3: Diferentes estrategias de terapia celular adoptiva. (A) Los linfocitos T se aíslan de la sangre del paciente para transducir con un TCR diseñado que es específico para un antígeno tumoral. Luego, los linfocitos T modificados con TCR se expanden *in vitro* y se vuelven a infundir al paciente. (B) Los linfocitos T se aíslan de la sangre del paciente para transducir con un CAR que es específico para un antígeno tumoral. Luego, los linfocitos modificados con CAR se expanden *in vitro* y se vuelven a infundir al paciente. (C) Posterior a la extracción del tumor, los TILs antitumorales se aíslan y se expanden *in vitro* para volver a infundir al paciente. TCR: receptor de célula T; CAR: receptor de antígeno quimérico; TILs: linfocitos infiltrantes de tumor. Figura creada en BioRender.

Células inmunes endógenas y régimen de linfodepleción en la terapia celular adoptiva

A pesar de los grandes avances en el ámbito de la inmunoterapia, la ACT no funciona en la mayoría de los pacientes con tumores sólidos. Los obstáculos más importantes para una respuesta inmune eficaz y duradera es que las células transferidas presentan poca persistencia en el tiempo y, regularmente, las células tumorales sufren mutaciones en el cual pierden el antígeno diana de la ACT, escapando del control inmune

(O'Donnell et al, 2019; Wylie et al, 2019). En consecuencia, la ACT se ha utilizado en combinación con otras estrategias terapéuticas que estimulan al compartimento endógeno de CTLs, que pueden ser específicos contra diferentes antígenos tumorales. Dentro de las estrategias terapéuticas se encuentran los virus oncolíticos y activadores de DCs, los cuales han demostrado lograr una protección duradera y superar la aparición de mutaciones en células tumorales que pierden antígenos (Lai et al, 2020). Además, resultados de nuestro laboratorio demuestran que una ACT efectiva y duradera promueve la infiltración de linfocitos T CD8⁺ endógenos de una forma dependiente de cDC1. Sumado a esto, la eficacia de la ACT disminuye al eliminar los linfocitos T CD8⁺ endógenos, al bloquear TNF- α o al eliminar las células cDC1 (Figuroa et al, 2024). Por lo tanto, la protección antitumoral efectiva y duradera demostrada por la ACT depende de tanto las células transferidas que tienen una actividad citotóxica aguda, como de los linfocitos T endógenos que pueden mediar una actividad inmune duradera.

Otra estrategia que se utiliza regularmente en la clínica es el uso de un régimen de linfodepleción no mieloablativo previo a la ACT, el cual tiene el objetivo de mejorar la persistencia de las células transferidas a través de la creación de un nicho intratumoral, la eliminación de células inmunorregulatorias y evitando la competición por citoquinas homeostáticas (Huang et al, 2005). La ciclofosfamida (Cy) corresponde a una droga quimioterapéutica que ejerce su acción a través del entrecruzamiento irreversible de las hebras de ADN, provocando la apoptosis en células altamente proliferativas, por lo tanto, previene la división celular y se ha utilizado ampliamente como un agente linfodepletante (Dudley et al, 2005). Sin embargo, la Cy afecta a todas las células en proliferación, incluyendo tejidos sanos, por lo que puede tener un gran impacto en el sistema inmune. Incluso, algunos estudios sugieren que la Cy y otros quimioterapéuticos similares promueven un microambiente metastásico en tumores primarios debido a daño epitelial, hipoxia, angiogénesis tumoral y liberación de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas (Karagiannis, Condeelis & Oktay, 2019). Por último, todavía no hay evidencia que explore los efectos a largo plazo asociado a su citotoxicidad.

Debido a los antecedentes entregados anteriormente, este proyecto exploró el uso de un régimen de linfodepleción con Cy y su efecto, tanto en las células inmunes

endógenas, como en las células transferidas en un modelo de ACT. Además, se determinó el impacto que genera un régimen de linfodepleción con Cy sobre la protección antitumoral a largo plazo otorgada por la ACT. Los resultados de esta tesis permitirán avanzar en un área del conocimiento emergente y sentar las bases para el desarrollo de inmunoterapias que tengan la capacidad de ser eficaces y duraderas contra tumores heterogéneos, como lo es el melanoma y otras neoplasias.

2. HIPÓTESIS

“El régimen de linfodepleción con ciclofosfamida, previo a la terapia celular adoptiva, produce una eliminación prolongada de los linfocitos T CD8⁺ endógenos y células dendríticas convencionales de tipo 1, perjudicando la respuesta inmune antitumoral y protección a largo plazo frente a una recurrencia tumoral”.

3. OBJETIVO GENERAL

Establecer si la ciclofosfamida, como régimen de linfodepleción previo a la terapia celular adoptiva, produce un impacto tanto en la respuesta inmune antitumoral endógena como en la protección a largo plazo.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Determinar el efecto del régimen de linfodepleción con ciclofosfamida en las células inmunes endógenas y células transferidas en un modelo de ACT de melanoma murino.

1.1 Analizar el efecto de la ciclofosfamida sobre las células inmunes endógenas en un corto y largo de tiempo.

1.2 Evaluar el efecto de la ciclofosfamida sobre las células inmunes endógenas y las células transferidas en un modelo de ACT.

2) Identificar el impacto del régimen de linfodepleción con ciclofosfamida en la protección antitumoral otorgada por la ACT.

2.1 Evaluar el impacto de la ciclofosfamida en la eficacia de la ACT a corto plazo.

2.2 Analizar el impacto de la ciclofosfamida en la eficacia de la ACT a largo plazo.

5. MATERIALES

5.1 Materiales biológicos

5.1.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones hembras silvestres de la cepa C57BL/6J y ratones hembras C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/J (ratones OT-I), comprados en The Jackson Laboratories y mantenidos en el bioterio de la Fundación Ciencia & Vida. Los ratones fueron mantenidos a una temperatura de 26°- 28°C, en ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, con agua y alimento *ad libitum*. Al comenzar los experimentos los ratones tenían entre 6 y 12 semanas de edad. Al cumplir los criterios de eutanasia según las normas bioéticas o al finalizar el curso de los experimentos, los ratones fueron sacrificados en cámara de CO₂ a un flujo de 2,5 L/min y posterior confirmación con dislocación cervical. Para los procedimientos en que los ratones se inyectaron en el flanco (desafío o re-desafío tumoral), se utilizó aproximadamente 3% (volumen/volumen) de sevoflurano (Baxter FDG9117) como anestésico inhalable. Todos los experimentos se realizaron conforme a las normas bioéticas exigidas por el Comité de Bioética de la Fundación Ciencia & Vida (P024/2021) y la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT).

5.1.2 Líneas Celulares

Como modelo de estudio se utilizó la línea celular de melanoma murino B16F10-OTI, la cual se obtuvo previamente en el laboratorio a través de la transducción de células B16F10 silvestres con un vector lentiviral que contiene la secuencia para expresar el péptido inmunodominante de la proteína OVA (OVA₂₅₇₋₂₆₄ o OTI). Esta fue cultivada a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, en medio RPMI-1640 (Hyclone SH30096.02) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco 10437-028), 2 mM de dipéptido L-alanil-L-glutamina (Gibco 35050-061), 1 mM de piruvato de sodio (Gibco 11360-070), 0,7 de mM de aminoácidos no esenciales encontrados en el medio esencial mínimo (Gibco

11140-050), 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina (Gibco 15140122), en adelante RPMI suplementado.

5.1.3 Anticuerpos

Para caracterizar los marcadores de superficie de membrana y marcadores intracelulares de las poblaciones de interés se desarrollaron paneles de anticuerpos según marcadores específicos de cada grupo celular. La unión no específica fue bloqueada con anticuerpo de rata anti-ratón CD16/CD32 (clon 93; Biolegend). En los paneles se utilizaron los anticuerpos monoclonales anti CD4 / FITC (clon GK1.5); anti CD25 / FITC (clon 3C7); anti CD3 / PE (17A2); anti CD25 / PE (clon 3C7); anti PD-1 / PE (clon 29F.1A12); anti CD127 / PE (clon AFR34); anti B220 / PE-Cy5 (clon RA3-6B2); anti CD8 α / PerCP (clon 53-6.7); anti CD4 / PerCP (clon GK1.5); anti I-A/I-E / PerCP (clon M5/114.15.2); anti CD3 / PE-Cy7 (clon 17A2); anti CD45.1 / PE-Cy7 (clon A20); anti Ly6G / PE-Cy7 (clon 1A8); anti CD45 / Alexa Fluor 700 (clon 30-F11); anti CD19 / APC (clon 6D5); anti CD69 / APC (clon H1.2F3); anti CD45 / APC-Cy7 (clon 30-F11); anti CD45.2 / APC-Cy7 (clon 104); anti I-A/I-E / APC-Cy7 (clon M5/114.15.2); anti CD62L / APC-Cy7 (clon MEL14); anti CD11c / APC-Cy7 (clon N418); anti CD3 / Brilliant Violet 421 (clon 17A2); anti CD8 α / Brilliant Violet 421 (clon 53-6.7); anti CD24 / Brilliant Violet 421 (clon M1/69); anti CD11b / Brilliant Violet 421 (clon M1/70); anti Ly6C / Brilliant Violet 605 (HK1.4); anti TIM3 / Brilliant Violet 605 (clon RMT3-23); anti CD8 α / Brilliant Violet 650 (clon 53-6.7); anti XCR1 / Brilliant Violet 650 (clon ZET); anti CD3 / Brilliant Violet 711 (clon 17A2); anti CD44 / Brilliant Violet 711 (clon IM7); anti CD11c / Brilliant Violet 711 (clon N418); anti CD45 / Brilliant Violet 785 (clon 30-F11); anti CD11b / Brilliant Violet 785 (clon M1/70). Todos provenientes de BioLegend. El anticuerpo monoclonal anti GzmB / PE-Texas Red (clon GB11) fue obtenido de Invitrogen.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cultivo de la línea B16F10 y B16F10-OTI

Las células B16F10 y B16F10-OTI fueron cultivadas en placas de 100 x 15 mm (Thermo Scientific 150350). La cosecha de las células se realizó durante la fase exponencial (aproximadamente 70-80% de confluencia), mediante tratamiento con tripsina 0,25% más EDTA 0,1% (HyClone 25200056) durante 3 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células fueron suspendidas en 5 mL de RPMI suplementado y centrifugadas a 400 x g durante 5 minutos, y el pellet de células resultante se resuspendió en RPMI suplementado para ser sembradas nuevamente. Luego de 24 horas, el medio de cultivo fue reemplazado por medio RPMI suplementado fresco luego de un lavado con PBS 1X (Corning 21-040-CMX12). En algunas ocasiones, las células fueron almacenadas en medio de congelación (FBS inactivado más DMSO 10%) y se conservaron en un congelador a -80 °C hasta su uso.

6.2 Desafíos tumorales

Como modelo de melanoma cutáneo, se inyectó por vía intradérmica 1×10^6 de células B16F10 o B16F10-OTI en PBS 1X estéril, en forma similar a los descrito por Baird et al., 2013. Para esto, las células fueron cosechadas como se describió en el punto anterior. Las células en suspensión se lavaron 3 veces con PBS 1X estéril y fueron centrifugadas a 400 x g durante 5 minutos, luego fueron filtradas con cell strainer de 70 μm (Falcon 352350) y contadas mediante una cámara de Neubauer. Las células se llevaron a una concentración de 2×10^7 células/mL en PBS 1X estéril. Cada ratón fue inoculado con 1×10^6 células en 50 μL . Esta inoculación se realizó en el flanco derecho para los desafíos tumorales primarios. Para los redesaríos tumorales, los ratones fueron inoculados en el flanco izquierdo.

6.3 Activación *in vitro* de linfocitos T CD8⁺ OTI

Para conseguir los linfocitos T CD8⁺ específicos contra el antígeno OTI, se utilizó un ratón transgénico C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/J (OT-1, The Jackson Laboratory).

Las células del bazo fueron extraídas y los linfocitos T CD8⁺ específicos contra el antígeno OTI fueron estimulados con el péptido OTI (OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎, GenScript RP10611) a una concentración de 2 µg/mL con la presencia de IL-2 a una concentración de 100 UI/mL (Biolegend 589108) durante 96 horas en medio RPMI suplementado y 50 µM de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich M3148).

6.4 Transferencia de linfocitos T CD8⁺ OTI previamente activados *in vitro*

Para la terapia celular adoptiva, los linfocitos T CD8⁺ OTI previamente activados *in vitro* fueron transferidos a ratones portadores de tumores B16F10-OTI 7 días después del desafío tumoral. Para esto, los linfocitos T CD8⁺ OTI previamente activados *in vitro* fueron recolectados y lavados dos veces con PBS 1X estéril, posteriormente se contaron las células mediante una cámara de Neubauer. Luego, las células se llevaron a una concentración de 1x10⁷ (ACT óptima) o 5x10⁶ (ACT subóptima) células/mL en PBS 1X estéril. Cada ratón fue inyectado con 1x10⁶ células en 100 µL (ACT óptima) o 5x10⁵ en 100 µL (ACT subóptima) por vía intravenosa, en forma similar a los descrito por Harimoto et al. 2013.

6.5 Obtención de muestras de sangre

Se extrajeron muestras de aproximadamente 200 a 300 µL de sangre desde la vena de la cola del ratón 12 días después del desafío tumoral. Estas muestras fueron recolectadas en tubos Eppendorf de 1,5 mL en presencia de 70 µL de una solución de heparina sódica a una concentración de 500 UI/mL (Sanderson 75KI2088) diluida en PBS 1X estéril.

6.6 Crecimientos tumorales

El crecimiento tumoral fue evaluado durante los días posteriores al desafío tumoral mediante la medición de los diámetros tumorales con un calíper digital. Cada parámetro de ancho, largo y altura fue medido en triplicado. Conforme a las normas bioética, en el caso de ser requerido, los ratones fueron sacrificados cuando el diámetro más grande del tumor alcanzaba ≥ 15mm, cuando el ratón evidenciara malestar físico o cuando el tumor

presentaba úlceras. La fórmula utilizada para calcular el volumen tumoral es la recomendada en Faustino-Rocha et al. 2013.

$$(\text{Ancho}^2 \text{ (mm}^2\text{)} \times \text{Largo (mm)}) / 2 = \text{Volumen del tumor (mm}^3\text{)}$$

6.7 Tinción para citometría de flujo

En el primer objetivo específico se requirió la citometría de flujo. Todos los datos de citometría obtenidos fueron analizados con el programa FlowJo_V10 (Tree Star, Inc.).

6.8 Preparación de suspensiones celulares

La identificación de distintos tipos celulares se realizó mediante citometría de flujo utilizando el equipo BD FACSymphony A1 de la Fundación Ciencia & Vida. La obtención de suspensiones unicelulares para citometría a partir de los tejidos de sangre periférica, nódulos linfáticos drenantes de tumor y tumor ha sido refinada en el Laboratorio de Inmunoncología (Gálvez-Cancino et al. 2018).

Para favorecer la lisis de eritrocitos en las muestras sangre periférica, estas fueron tratadas con 3 mL de una solución comercial de RBC 1X (Biolegend 420301) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, la lisis se detuvo adicionando 7 mL de una solución de PBS 1X estéril.

Los nódulos linfáticos drenantes de tumor fueron extraídos 10 días (corto plazo) o 33 días (largo plazo) después del desafío tumoral. Luego, estos fueron disgregados mecánicamente con agujas de 21G x 1-1/2" y digeridas enzimáticamente con 5 µg/mL de DNasa I (AppliChem A3778,0010) y 5 mg/mL de colagenasa IV (Gibco 17104019) en 1mL de medio RPMI-1640 durante 15 minutos a 37°C en un incubador. Las enzimas utilizadas fueron diluidas en HBSS 1X en presencia de Ca⁺² y Mg⁺² (Gibco 14025092). Posteriormente, la reacción enzimática se detuvo adicionando 1mL de una solución 5 mM

de EDTA (Invitrogen 15576-028) en RPMI suplementado. Finalmente, los nódulos linfáticos digeridos fueron filtrados con cell strainer de 70 μm .

El protocolo para disgregar tumores es similar al utilizado en los nódulos linfáticos drenantes de tumor. Primero, estos fueron extraídos 10 días (corto plazo) o 33 días (largo plazo) después del desafío tumoral. Luego, estos fueron disgregados mecánicamente con tijeras quirúrgicas para obtener trozos de aproximadamente 3 mm. Posteriormente, los trozos se disgregaron enzimáticamente con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNasa I y 5 mg/mL de colagenasa en 1mL de medio RPMI-1640 durante 60 minutos a 37°C bajo 160 rpm de agitación en un incubador-agitador. Luego, la reacción enzimática se detuvo adicionando 1mL de una solución 5 mM de EDTA en RPMI suplementado. Finalmente, los tumores digeridos fueron filtrados con cell strainer de 70 μm .

6.9 Incubación con anticuerpos y marcador de viabilidad

Para bloquear la unión de anticuerpos a receptores de fracciones constantes, todas las muestras fueron tratadas con el anticuerpo de rata anti-ratón CD16/CD32 (clon 93 de Biolegend) diluido 1:100 en PBS 1X estéril, entre 5-10 minutos a 4°C. Los mix de anticuerpos de superficie de membrana y el marcador de viabilidad celular Zombie Aqua™ (Biolegend 423101) fueron disueltos en PBS 1X estéril y se incubaron en cada muestra durante 20 minutos a 4°C en oscuridad.

6.10 Tinción de moléculas intracelulares

En algunas ocasiones, se requirió evaluar la expresión de moléculas intracelulares. Para esto, las muestras fueron incubadas con los anticuerpos de superficie de membrana según lo descrito en el punto anterior. Luego, las muestras fueron fijadas y permeabilizadas mediante un kit comercial (BD 555028). Este consistió en la incubación de las muestras con el reactivo Cytotfix/cytoperm™ (BD, 554722) durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente, las muestras se lavaron con Perm/wash™ (BD, 554723) y se incubaron con el mix de anticuerpos intracelulares diluidos en Perm/wash™ durante 20 minutos a 4°C.

6.11 Cuantificación de poblaciones celulares.

Para la cuantificación absoluta de las distintas poblaciones celulares identificadas a través de citometría de flujo, se utilizó el kit comercial CountBright™ absolut counting bead (C36950 Invitrogen), y las muestras fueron analizadas junto con las beads en el equipo BD FACSymphony A1 de la Fundación Ciencia & Vida.

6.12 Análisis estadísticos

Los resultados fueron expresados como promedios \pm error estándar de la media de experimentos independientes. Los análisis estadísticos y los gráficos fueron generados mediante el programa GraphPad Prism V9 (La Jolla, California, USA). Se utilizó el test no pareado de Mann-Whitney para analizar diferencias entre 2 grupos con una sola variable. Además, se utilizó el test de ANOVA de dos vías y corrección de Bonferroni para comparar las curvas de crecimiento tumoral. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

7. RESULTADOS

Objetivo específico 1: “Determinar el efecto del régimen de linfodepleción con ciclofosfamida en las células inmunes endógenas y células transferidas en un modelo de ACT de melanoma murino”

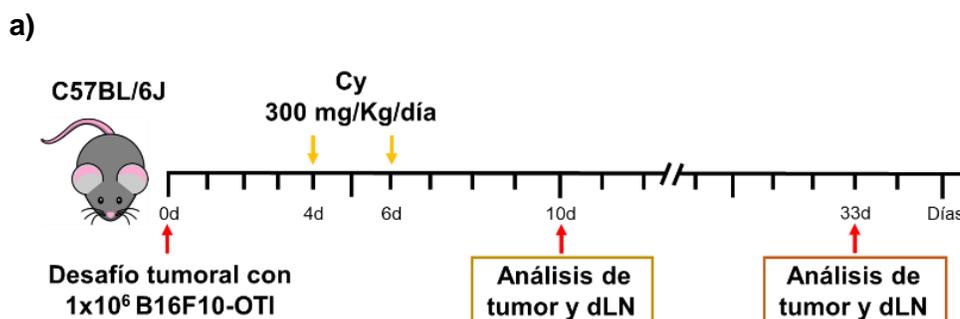
1.1 Analizar el efecto de la ciclofosfamida sobre las células inmunes endógenas en un período corto y largo de tiempo.

En primera instancia, se exploró el efecto de un régimen de linfodepleción sobre las células inmunes endógenas. Para esto, se utilizó un modelo murino inmunocompetente denominado C57BL/6J, el cual se ha utilizado ampliamente para estudios de las respuestas antitumorales y respuestas inmunológicas, además de su facilidad de uso y manejo. Debido a que la terapia celular adoptiva se dirige principalmente a pacientes con cáncer, se implementó un modelo de melanoma murino que consiste en una inyección intradérmica con células B16F10-OTI en el flanco derecho de ratones C57BL/6J y permite, en aproximadamente 7 días, generar tumores de melanoma en la piel de los ratones de un volumen aproximado de 100 mm³, el cual puede ser analizado a través de diferentes técnicas experimentales bioquímicas e inmunológicas. La ventaja que tiene utilizar B16F10-OTI como modelo tumoral es que esta proviene de la línea celular de melanoma murino B16F10 que fue modificada genéticamente para expresar el antígeno OTI, el cual corresponde al péptido inmunodominante de la proteína ovoalbúmina (OVA). Por lo tanto, este modelo tumoral genera respuestas inmunes específicas contra este antígeno y, además, es posible utilizar este antígeno como molécula blanco para la terapia celular adoptiva. Por otro lado, ya que los pacientes que reciben terapia celular adoptiva se les administra un régimen de linfodepleción previo a la transferencia adoptiva, se aplicó de manera intraperitoneal a los ratones C57BL/6J un régimen de linfodepleción con un agente quimioterapéutico utilizado ampliamente en la clínica, denominado ciclofosfamida (Cy).

El régimen de linfodepleción se administra principalmente como dos dosis de Cy en días continuos, por lo que ratones C57BL/6J portadores de tumores B16F10-OTI se les suministró dos dosis de Cy los días 4 y 6 después del desafío tumoral, para analizar tanto el tejido del tumor como el nódulo drenante de tumor (dLN) a través de citometría de flujo en dos tiempos diferentes, 4 días o 27 días después de la última dosis de Cy (*Figura 4a*).

En primera instancia, la Cy no influye en el crecimiento tumoral a corto plazo; sin embargo, a largo plazo, su efecto se observa en un retraso del crecimiento tumoral, lo cual podría estar relacionado con la eliminación de células tumorales de alta proliferación (*Figura 4b, 4c y 4d*). Interesantemente, en el tumor, la Cy elimina los linfocitos T CD8⁺ endógenos en un corto período de tiempo, sin embargo, estos vuelven a repoblarse al cabo de 4 semanas después de la última dosis de Cy (*Figura 4e, 4f*). Los linfocitos T CD8⁺ se han clasificado en subpoblaciones dependiendo de la expresión de diferentes moléculas, por ejemplo, los linfocitos progenitores exhaustos (T_{pex}) se caracterizan por una elevada expresión de PD-1 y TCF-1, pero carecen de moléculas efectoras como GzmB. Por otro lado, los linfocitos terminalmente diferenciados (T_{diff}) mantienen una expresión elevada de PD-1, pero comienzan a expresar moléculas efectoras como GzmB y disminuyen su expresión de TCF-1. Ambas subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos se han identificado como linfocitos que son reactivos contra el tumor y ambas se requieren para un efecto antitumoral (*Figura 4e*). Desafortunadamente, ambas subpoblaciones se ven comprometidas por la Cy, ya que al repoblarse los linfocitos T CD8⁺ endógenos, estos no logran adquirir un perfil T_{pex} o T_{diff} (*Figura 4g, 4h*).

Por otro lado, las células presentadoras de antígeno, en específico las células dendríticas convencionales de tipo 1 (cDC1), que se caracterizan por la expresión selectiva de XCR1, son importantes para la presentación de antígenos tumorales a linfocitos T y, en el caso de los linfocitos T CD8⁺, la consiguiente diferenciación a linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (*Figura 4e*). De acuerdo con lo esperado, la Cy elimina rápidamente a las cDC1 dentro del tejido tumoral. Sin embargo, de manera inesperada, estas no se logran repoblar en un largo período de tiempo, indicando que la Cy podría producir la incapacidad de generar presentación cruzada, ya que las cDC1 no están presentes en el tumor para capturar antígenos tumorales (*Figura 4i*).



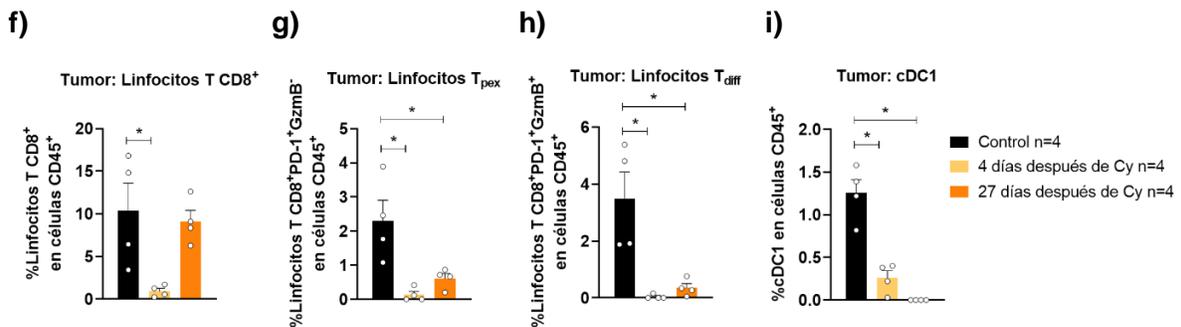
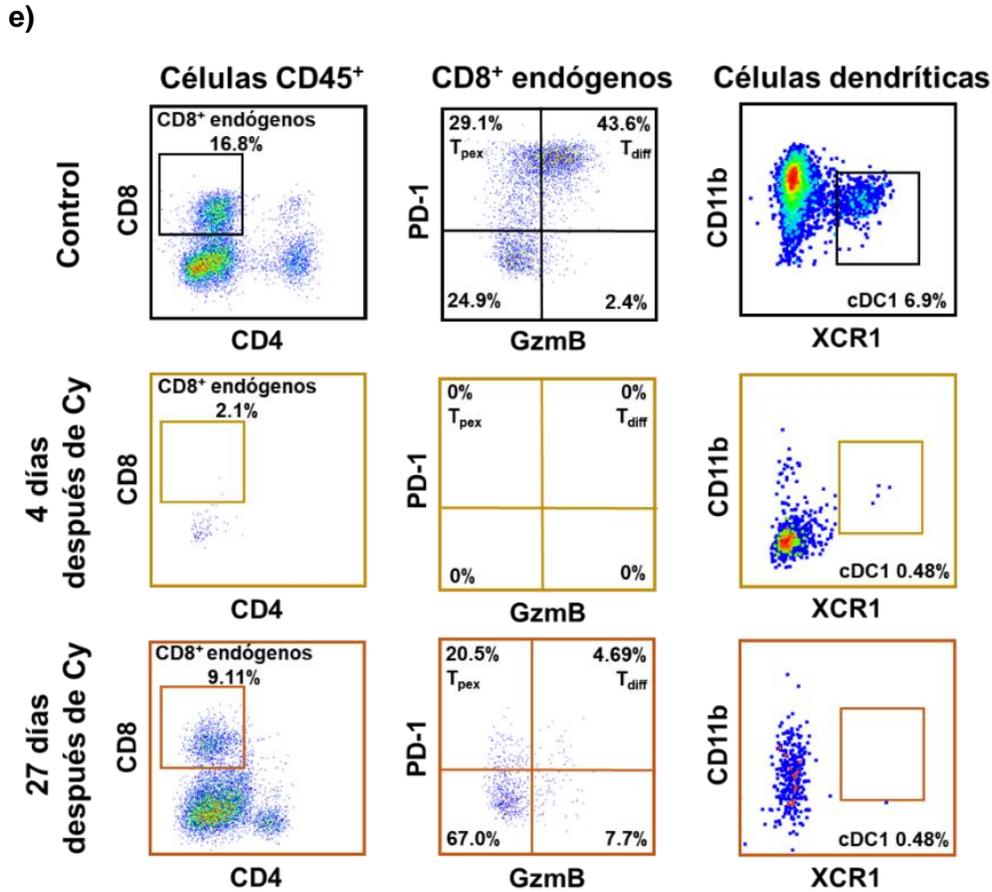
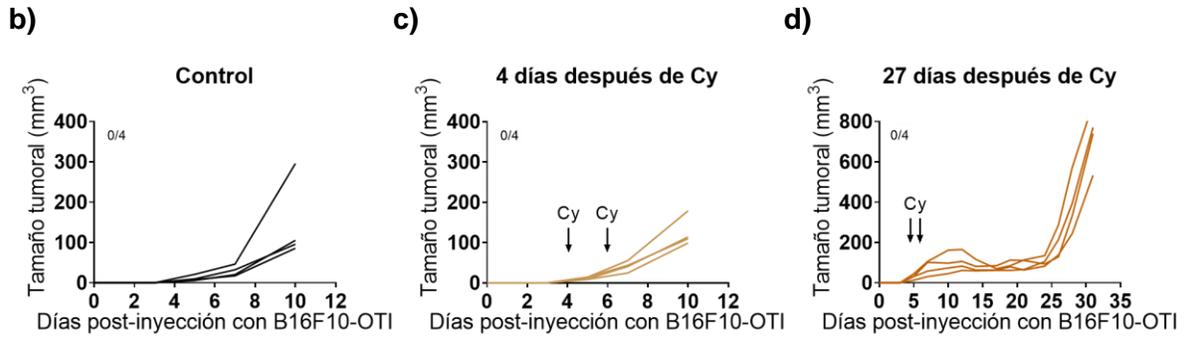


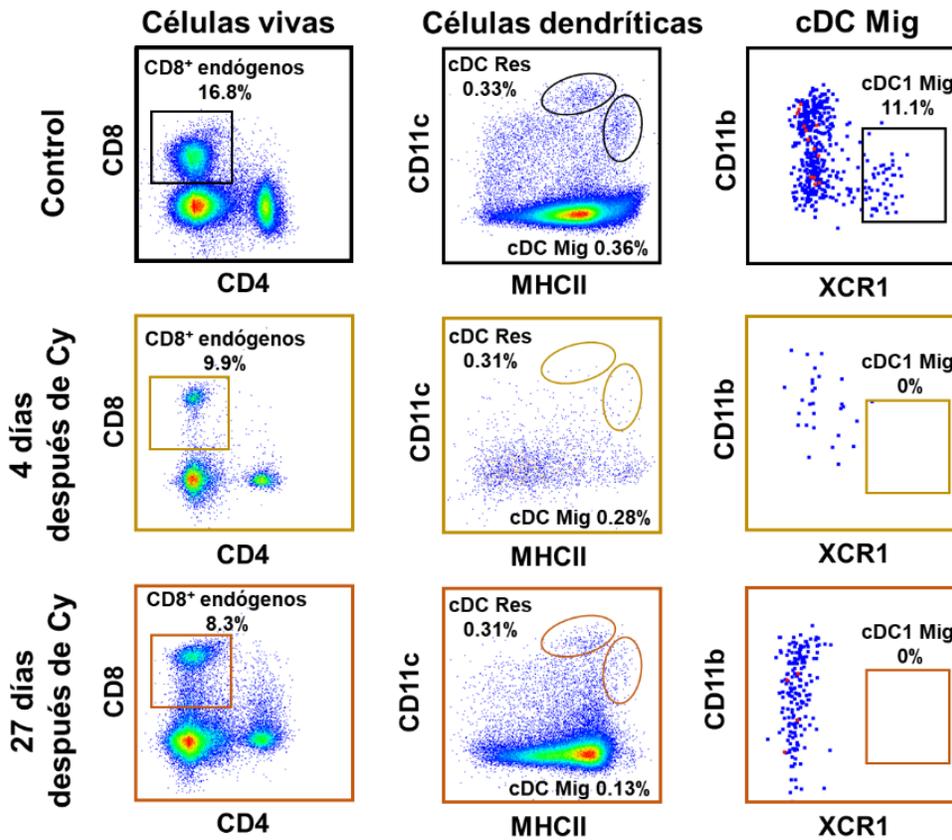
Figura 4: El régimen de linfodepleción con ciclofosfamida elimina a las subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺ reactivas contra el tumor y cDC1 intratumorales. Ratones de la cepa

C57BL/6J fueron desafiados mediante vía intradérmica con 1×10^6 células B16F10-OTI, posteriormente los ratones recibieron dos dosis de 300mg/Kg de Cy los días 4 y 6 después del desafío tumoral. Después, el tumor fue extraído 4 y 27 días después de la última dosis de Cy para analizar linfocitos T CD8⁺ endógenos y cDC1 a través de citometría de flujo. **(a)** Esquema experimental. b-d Curvas individuales de crecimiento tumoral de los grupos control **(b)**, 4 días después de Cy **(c)** y 27 días después de Cy **(d)**. **(e)** Panel izquierdo: gráficos de puntos representativos que muestran las frecuencias de los linfocitos T CD8⁺ endógenos en las células CD45⁺. Panel central: gráficos de puntos representativos que muestran la expresión de PD-1 y GzmB en los linfocitos T CD8⁺ endógenos y las frecuencias de las diferentes subpoblaciones mostradas en los cuadrantes: PD-1⁺ GzmB⁻ (T_{pex}), PD-1⁺ GzmB⁺ (T_{diff}), PD-1⁻ GzmB⁺ y PD-1⁻ GzmB⁻. Panel derecho: gráficos de puntos representativos que muestran las frecuencias de cDC1 intratumorales (CD11b⁻ XCR1⁺) en las células dendríticas. f-i Cuantificaciones relativas de los linfocitos T CD8⁺ endógenos **(f)**, subpoblación T_{pex} **(g)**, subpoblación T_{diff} **(h)** y cDC1 **(i)** como porcentaje sobre las células CD45⁺. Datos agrupados de 1 experimento independiente, n=4 ratones por grupo. Las barras son la media \pm EEM. *p \leq 0.05 para (c), (d), (e) y (f) mediante la prueba no pareada de Mann-Whitney.

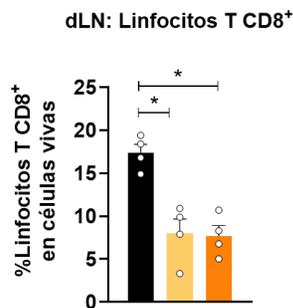
Además, debido a que el proceso de presentación de antígenos tumorales por las cDC1 a linfocitos T CD8⁺ se lleva a cabo en los órganos linfoides secundarios, se analizó el dLN de los ratones en las diferentes condiciones experimentales. De manera similar al tejido tumoral, la Cy elimina al menos la mitad de los linfocitos T CD8⁺ endógenos presentes en el dLN a los 4 días después de la última dosis de Cy. Sin embargo, a diferencia del tumor, los linfocitos T CD8⁺ endógenos no logran recuperarse por completo en un largo período de tiempo (*Figura 5a, 5b*).

Añadido a esto, las cDC1 migratorias, que expresan altos niveles de MHCII y son importantes para la presentación antigénica a linfocitos T CD8⁺ (Kedl et al, 2017), son eliminadas por completo por la Cy. Intrigantemente, esta depleción de cDC1 por la Cy se mantiene en un largo período de tiempo, el cual es un efecto similar a lo observado en el tumor (*Figura 5a, 5c*). Estos resultados podrían indicar que la presentación de antígenos tumorales por parte de las cDC1 a linfocitos T CD8⁺ vírgenes en los órganos linfoides secundarios está siendo interrumpida por el régimen de linfodepleción con Cy.

a)



b)



c)

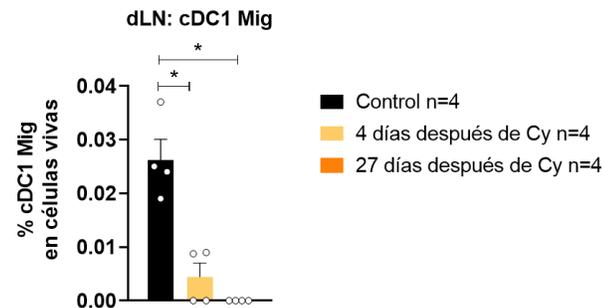


Figura 5: El régimen de linfodepleción con ciclofosfamida elimina los linfocitos T CD8+ endógenos y cDC1 migratorias en dLN. Ratones de la cepa C57BL/6J fueron desafiados mediante vía intradérmica con 1×10^6 células B16F10-OT1, posteriormente los ratones recibieron dos dosis de 300mg/Kg de Cy los días 4 y 6 después del desafío tumoral. Después, el dLN fue extraído 4 y 27 días después de la última dosis de Cy para analizar linfocitos T CD8+ endógenos y cDC1 migratorias a través de citometría de flujo. (a) Panel izquierdo: gráficos de puntos representativos que muestran las frecuencias de los linfocitos T CD8+ endógenos en las células vivas. Panel central: gráficos de puntos representativos que muestran frecuencias de las subpoblaciones de células dendríticas residentes (cDC Res) y migratorias (cDC Mig) en el total de

las células dendríticas. Panel derecho: gráficos de puntos representativos que muestran la frecuencia de cDC1 migratorias (MHCII^{high}CD11b⁻XCR1⁺) en las cDC mig. b-c Cuantificaciones relativas de los linfocitos T CD8⁺ endógenos (b) y cDC1 mig (c) como porcentaje sobre las células vivas. Datos agrupados de 1 experimento independiente, n=4 ratones por grupo. Las barras son la media ± EEM. *p≤0.05 para (b) y (c) mediante la prueba no pareada de Mann-Whitney.

1.2 Evaluar el efecto de la ciclofosfamida sobre las células inmunes endógenas y las células transferidas en un modelo de ACT.

Anteriormente, se analizó el efecto de la Cy sobre las células inmunes endógenas, en específico, los linfocitos T CD8⁺ endógenos y las cDC1. Sin embargo, en un contexto de ACT, el efecto de la Cy sobre los linfocitos T CD8⁺ transferidos y endógenos no se ha dilucidado completamente. Por esta razón, ratones C57BL/6J portadores de tumores B16F10-OTI fueron suministrados con dos dosis de Cy los días 4 y 6 después del desafío tumoral. Luego, se les administró la ACT al día 7 después del desafío tumoral y 5 días después se analizó la sangre periférica a través de citometría de flujo (*Figura 6a*). Como la ACT consiste en la transferencia de linfocitos específicos contra antígenos tumorales que han sido previamente activos *in vitro*, se utilizó ratones transgénicos OTI (C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/J, Jackson Laboratories) ya que contienen linfocitos T CD8⁺ que portan un TCR específico para el antígeno OTI y además expresan la variante alélica CD45.1, permitiendo identificar estos linfocitos con un anticuerpo monoclonal a través de citometría de flujo. Estos linfocitos se activaron a través de la incubación de estos con el péptido SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄ o OTI) más la presencia de IL-2.

En primera instancia, la ACT produce una tendencia a aumentar las células de la línea hematopoyética (células CD45⁺) en sangre periférica, lo cual es esperable después de la administración de linfocitos OTI, ya que estos son positivos para la proteína CD45. Además, el régimen de linfodepleción con Cy elimina al menos la mitad de las células de la línea hematopoyética en sangre periférica (*Figura 6c*), entregando un mayor espacio a los linfocitos transferidos para expandirse, según lo que se ha descrito en la literatura. Por otro lado, la ACT no incide mayormente sobre los linfocitos T CD8⁺ endógenos en sangre periférica, sin embargo, al administrar el régimen de linfodepleción con Cy a los ratones tratados con ACT, los linfocitos T CD8⁺ endógenos se eliminan por completo en sangre periférica (*Figura 6b, 6d*), el cual es un resultado similar al visto anteriormente en el tumor (*Figura 4c*). Por último, los linfocitos OTI transferidos pueden ser reconocidos en sangre

periférica con el anticuerpo monoclonal específico para la variante CD45.1 a través de citometría de flujo (*Figura 6b*). Interesantemente, el régimen de linfodepleción con Cy incrementa el número de linfocitos OTI transferidos en sangre periférica, lo cual podría indicar que la Cy permite la expansión de los linfocitos transferidos (*Figura 6e*).

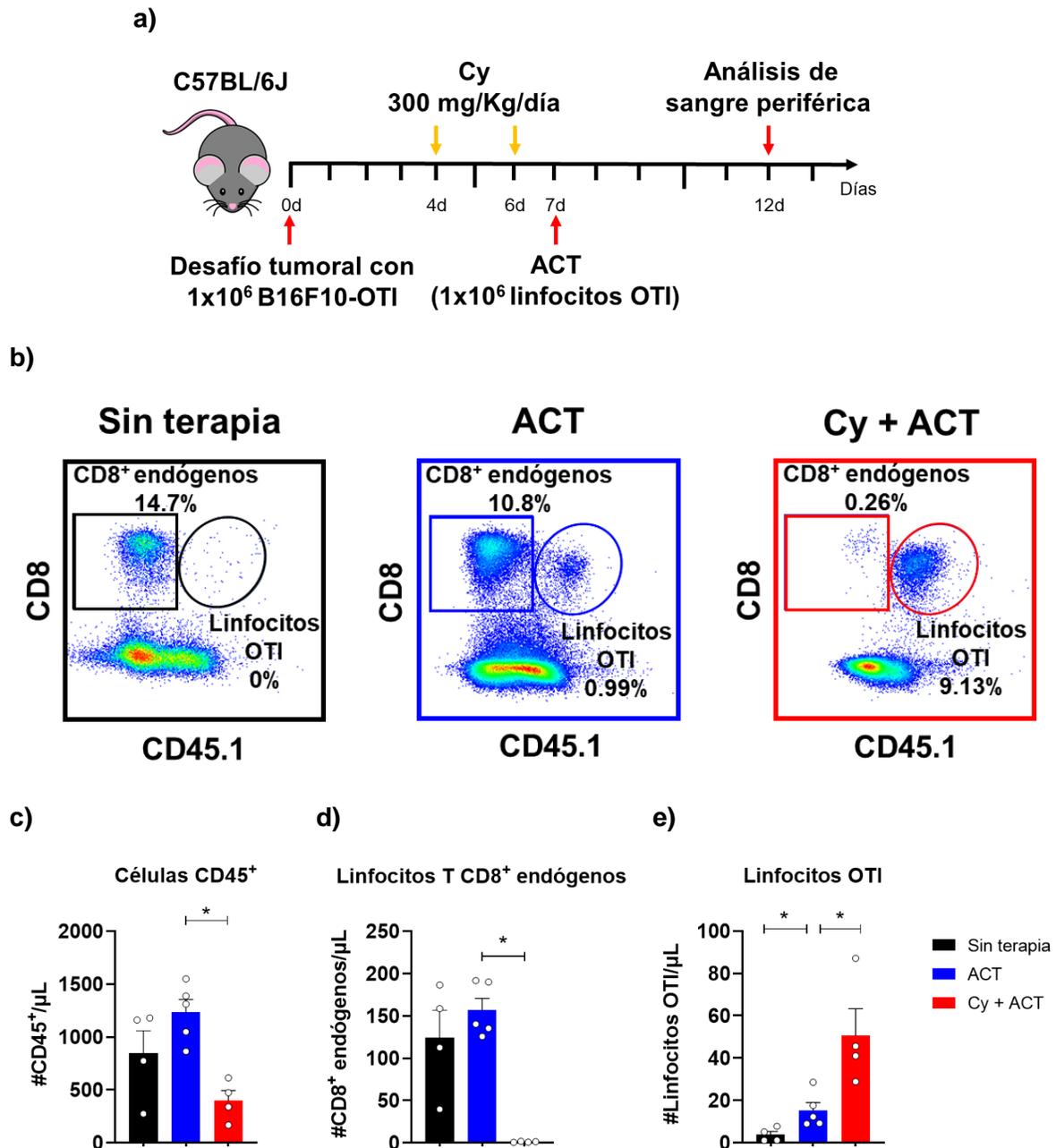


Figura 6: El régimen de linfodepleción con ciclofosfamida elimina los linfocitos T CD8⁺ endógenos e induce la expansión de los linfocitos OTI transferidos en sangre periférica. R ratones de la cepa C57BL/6J fueron desafiados mediante vía intradérmica con 1×10^6 células

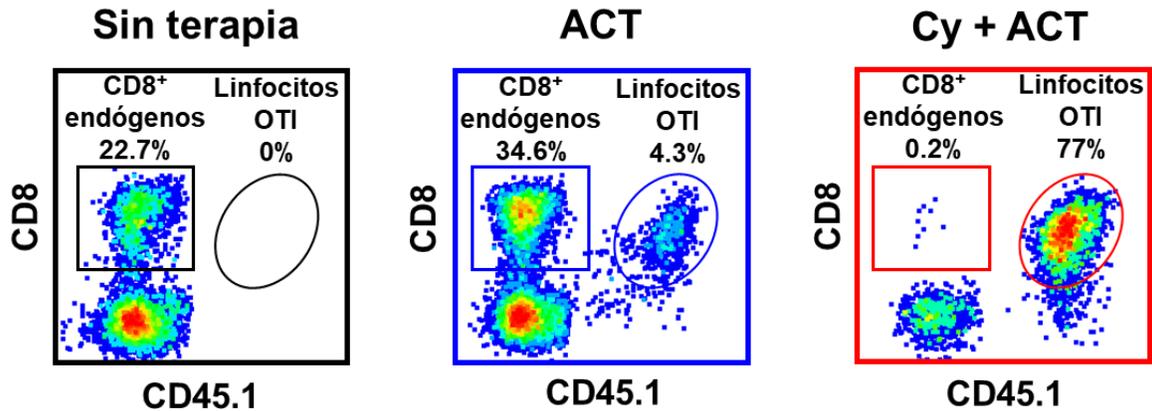
B16F10-OTI, posteriormente los ratones recibieron dos dosis de 300mg/Kg de Cy los días 4 y 6 después del desafío tumoral. Un día después, los ratones fueron transferidos con 1×10^6 de linfocitos OTI previamente activados *in vitro* (ACT). Finalmente, la sangre periférica fue extraída 5 días después de la ACT para analizar tanto los linfocitos T CD8⁺ endógenos como los linfocitos OTI transferidos. **(a)** Esquema experimental. **(b)** Gráficos de puntos representativos que muestran las frecuencias de los linfocitos T CD8⁺ endógenos y los linfocitos OTI transferidos sobre las células CD45⁺ en los grupos de ratones sin terapia, ratones que recibieron ACT y ratones que recibieron Cy + ACT. c-e Cuantificaciones absolutas de las células CD45⁺ **(c)**, los linfocitos T CD8⁺ endógenos **(d)** y linfocitos OTI transferidos **(e)** como número (#) de células por μL de sangre periférica. Datos agrupados de 1 experimento independiente, n=4-5 ratones por grupo. Las barras son la media \pm EEM. * $p \leq 0.05$ para (c), (d) y (e) mediante la prueba no pareada de Mann-Whitney.

A pesar de haber analizado el efecto del régimen de linfodepleción con Cy sobre los linfocitos T CD8⁺ en sangre periférica, se requiere saber si los linfocitos T CD8⁺ endógenos y linfocitos OTI transferidos logran infiltrar en el tejido tumoral y cual podría ser el efecto que ejerce la Cy sobre estos. Por tal razón, se utilizó una estrategia experimental similar al presentado anteriormente, con la diferencia de que los tumores B16F10-OTI que portan los ratones fueron aislados y se analizaron los linfocitos infiltrantes de tumor 3 días después de la ACT a través de citometría de flujo.

Interesantemente, la ACT por sí sola induce un aumento, tanto en frecuencia como en número absoluto, de los linfocitos T CD8⁺ endógenos en aproximadamente el doble en comparación con el grupo de ratones sin terapia, lo cual podría indicar que la ACT mejora, directa o indirectamente, la infiltración intratumoral de los linfocitos T CD8⁺ endógenos (*Figura 7a, 7b*). Además, al administrar el régimen de linfodepleción con Cy, esta es capaz de eliminar por completo a los linfocitos T CD8⁺ endógenos infiltrados en el tumor (*Figura 7a, 7c*), un resultado similar al visto anteriormente en sangre periférica.

Por otro lado, los linfocitos OTI transferidos logran infiltrar en el tejido tumoral de los ratones que recibieron ACT, los cuales expresan la variante alélica CD45.1 (*Figura 7a*). Añadido a esto, el régimen de linfodepleción con Cy incrementa tanto en frecuencia como en número absoluto los linfocitos OTI transferidos dentro del tumor, aumentando aproximadamente 3 veces la cantidad de linfocitos OTI infiltrantes (*Figura 7d, 7f*).

a)



b)

c)

d)

e)

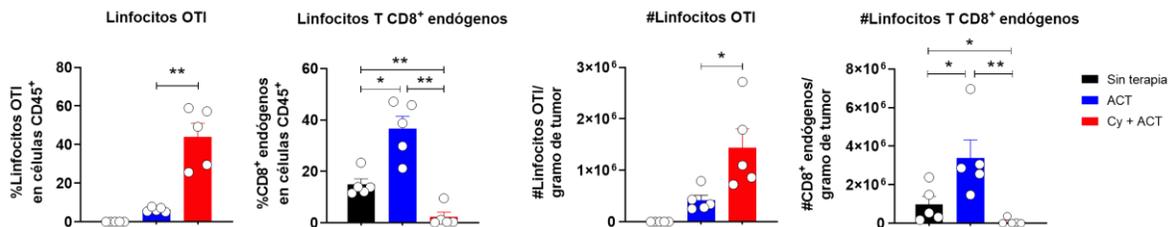


Figura 7: La ACT aumenta la infiltración intratumoral de los linfocitos T CD8⁺ endógenos y el régimen de linfodepleción con ciclofosfamida aumenta la infiltración intratumoral de los linfocitos OTI transferidos.

Ratones de la cepa C57BL/6J fueron desafiados mediante vía intradérmica con 1×10^6 células B16F10-OTI, posteriormente los ratones recibieron dos dosis de 300mg/Kg de Cy los días 4 y 6 después del desafío tumoral. Un día después, los ratones fueron transferidos con 1×10^6 de linfocitos OTI previamente activados *in vitro* (ACT). Finalmente, el tumor fue extraído 3 días después de la ACT para analizar tanto linfocitos T CD8⁺ endógenos como linfocitos OTI transferidos a través de citometría de flujo. **(a)** Gráficos de puntos representativos que muestran las frecuencias de los linfocitos T CD8⁺ endógenos y los linfocitos OTI transferidos sobre las células CD45⁺ en los grupos de ratones sin terapia, ratones que recibieron ACT y ratones que recibieron Cy + ACT. b-c Cuantificaciones relativas de los linfocitos OTI transferidos **(b)** y linfocitos T CD8⁺ endógenos **(c)** como porcentaje sobre las células CD45⁺. d-e Cuantificaciones absolutas de los linfocitos OTI transferidos **(d)** y linfocitos T CD8⁺ endógenos **(e)** como número (#) de células por gramo de tumor. Datos agrupados de 1 experimento independiente, n=5 ratones por grupo. Las barras son la media \pm EEM. *p<0.05 y **p<0.01 para (b), (c), (d) y (e) mediante la prueba no pareada de Mann-Whitney.

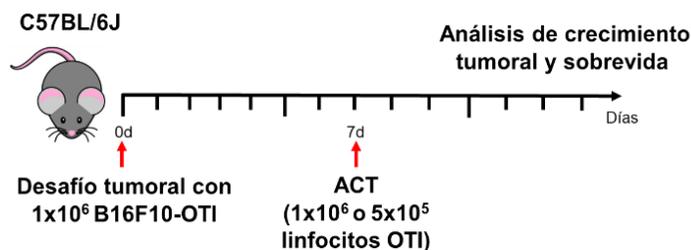
Objetivo específico 2: “Identificar el impacto del régimen de linfodepleción con ciclofosfamida en la protección antitumoral otorgada por la ACT”

2.1 Evaluar el impacto de la ciclofosfamida en la eficacia de la ACT a corto plazo.

Debido a que el régimen de linfodepleción con Cy se utiliza principalmente para dar soporte a los linfocitos transferidos de la ACT y así mejorar la eficacia de esta, se decidió estudiar como la Cy podría estar modulando la eficacia de la ACT. Para esto, lo primero que se realizó fue establecer dos protocolos de ACT, una terapia efectiva, la cual consiste en la administración de linfocitos T CD8⁺ OTI previamente activados *in vitro* a ratones portadores de tumores B16F10-OTI, y una terapia subóptima, la cual consiste en la administración de la mitad de la dosis entregada en la terapia efectiva. Para evaluar la efectividad de la ACT, se utilizaron dos aproximaciones, un análisis de curvas de crecimiento tumoral a través de la medición periódica del volumen tumoral y un análisis de sobrevida a través del estimador Kaplan-Meier (*Figura 8a*).

La inyección de células de melanoma murino B16F10-OTI en el flanco de los ratones genera tumores palpables al día 5 después del desafío tumoral y los tumores siguen creciendo de manera continua y descontrolada en los días posteriores al desafío tumoral (*Figura 8b*). Sin embargo, la ACT produce una regresión completa de los tumores, en el cual se elimina por completo a las células tumorales (*Figura 8c*). Además, al administrar la mitad de la dosis de la ACT (ACT subóptima), esta produce una regresión parcial de los tumores, probablemente debido a que no se eliminan todas las células tumorales y estas logran crecer descontroladamente (*Figura 8d*). Por otro lado, al realizar el análisis de sobrevida de los grupos de ratones estudiados, la ACT protege del desafío tumoral al 100% de los ratones al menos hasta el día 40, en cambio, los ratones que no recibieron ACT o que recibieron una ACT subóptima, disminuyen su porcentaje de sobrevida a 0% antes del día 28 después del desafío tumoral (*Figura 8e*).

a)



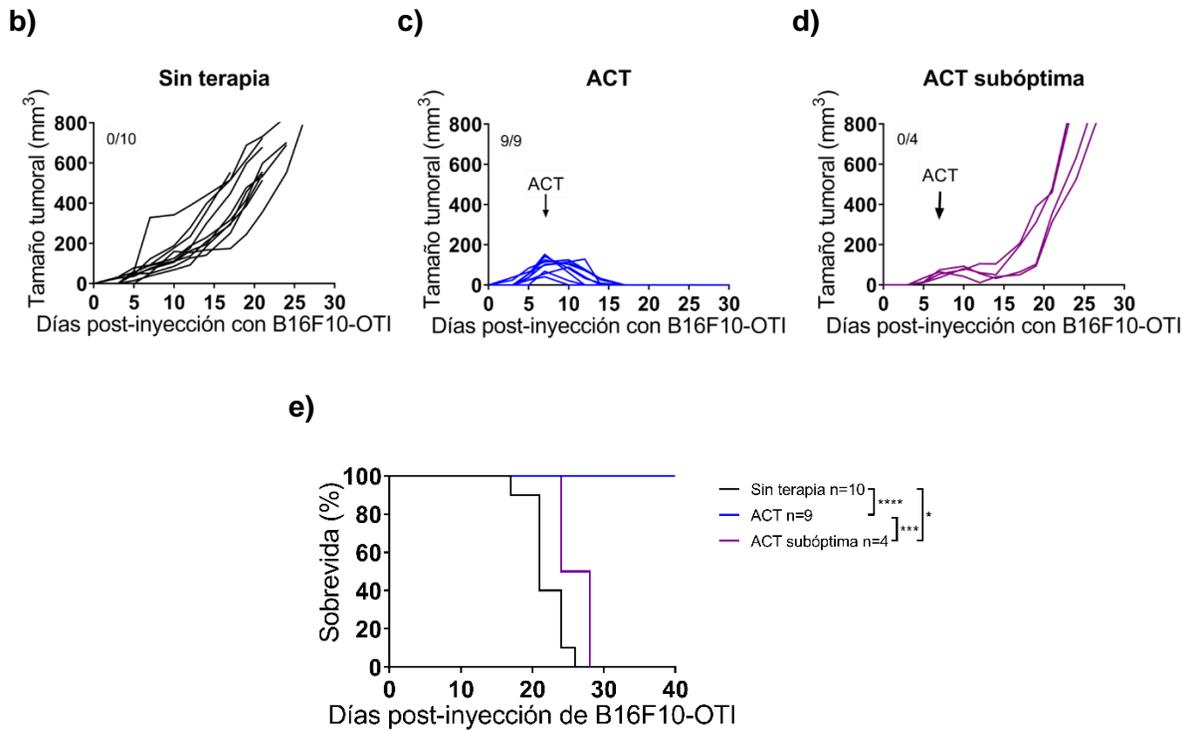


Figura 8: La ACT produce una regresión tumoral completa y una ACT subóptima la regresión parcial de tumores de melanoma murino. Ratones de la cepa C57BL/6J fueron desafiados mediante vía intradérmica con 1×10^6 células B16F10-OTI. Posteriormente, los ratones fueron transferidos con 1×10^6 o 5×10^5 de linfocitos OTI previamente activados *in vitro* (ACT o ACT subóptima). El volumen tumoral y sobrevida fue evaluado durante todo el transcurso del experimento. **(a)** Esquema experimental. b-d Curvas individuales de crecimiento tumoral de los grupos sin terapia **(b)**, ACT **(c)** y ACT subóptima **(d)**. **(e)** Análisis de sobrevida a través del estimador Kaplan-Meier de los grupos evaluados en b-d. Datos agrupados de 2 experimentos independientes para b,c y 1 experimento independiente para d, n=4-5 ratones por grupo. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$ para (e) mediante la prueba Mantel-Cox (prueba logrank).

Una vez que se establecieron y caracterizaron ambos protocolos de ACT, a los distintos grupos de ratones se les administró el régimen de linfodepleción con Cy para evaluar como esta podría estar afectando al crecimiento de los tumores. La Cy por si sola es capaz de producir una regresión parcial de los tumores B16F10-OTI, sin embargo, no logra eliminar a las células tumorales por completo, por lo que estas crecen descontroladamente después de varios días administrada la última dosis de Cy (*Figura 9a*). Según lo esperado, el régimen de linfodepleción con Cy no afecta significativamente a la ACT, ya que al menos 7 de 9 ratones presentaron una regresión tumoral completa (*Figura 9b*). No obstante, en un protocolo de ACT subóptima, el régimen de linfodepleción

con Cy logra mejorar la eficacia de la terapia (*Figura 9c*), el cual se condice con resultados de estudios clínicos, donde el régimen de linfodepleción previo a la ACT mejora las respuestas, completas o parciales, de los pacientes que reciben ACT (Dudley et al, 2005). Añadido a esto, los ratones que recibieron Cy pero no ACT tienen un porcentaje de supervivencia de 0% antes del día 30 después del desafío tumoral. Por el contrario, ambos grupos de ratones que recibieron ACT o ACT subóptima en conjunto con la Cy tienen un porcentaje de supervivencia mayor al 75% al menos hasta el día 40 después del desafío tumoral.

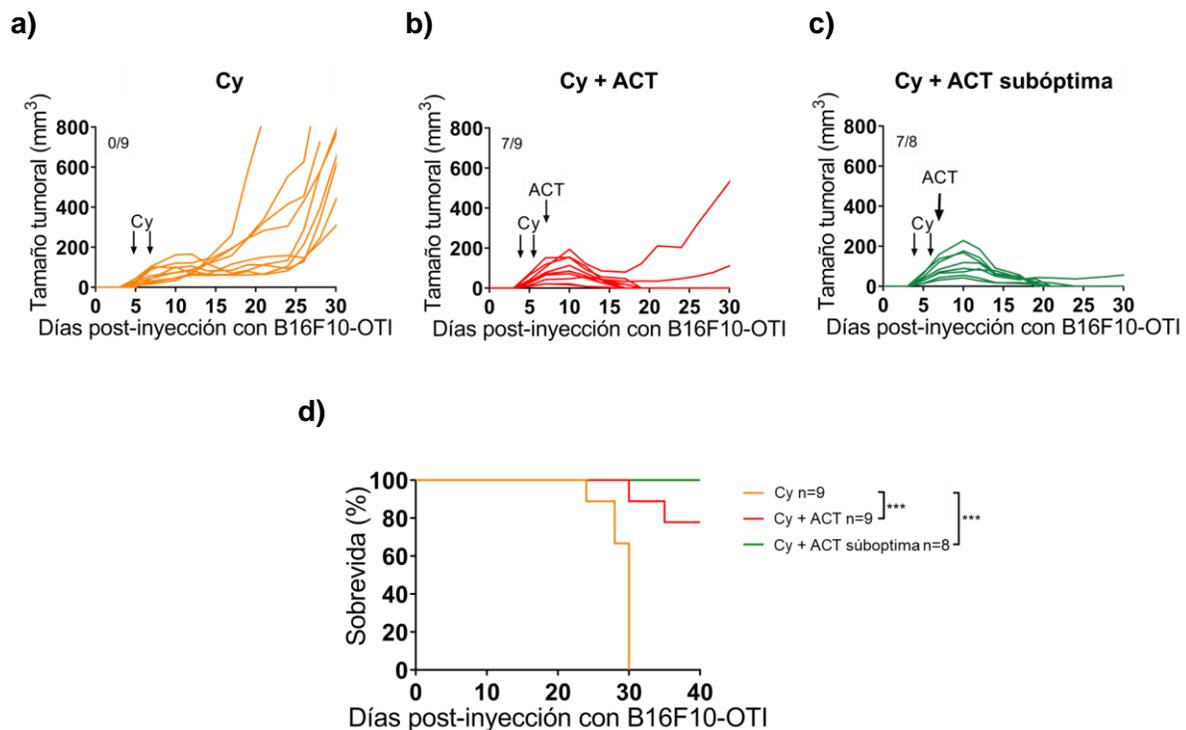


Figura 9: El régimen de linfodepleción con ciclofosfamida aumenta la eficacia antitumoral de una ACT subóptima en tumores sólidos. Ratones de la cepa C57BL/6J fueron desafiados mediante vía intradérmica con 1×10^6 células B16F10-OTI. Posteriormente, los ratones recibieron dos dosis de 300 mg/Kg de Cy los días 4 y 6 después del desafío tumoral. Luego, estos fueron transferidos con 1×10^6 o 5×10^5 de linfocitos OTI previamente activados *in vitro* (ACT o ACT subóptima). El volumen tumoral y supervivencia fue evaluado durante todo el transcurso del experimento. a-c Curvas individuales de crecimiento tumoral de los grupos Cy (a), Cy + ACT (b) y Cy + ACT subóptima (c). (d) Análisis de supervivencia a través del estimador Kaplan-Meier de los grupos evaluados en a-c. Datos agrupados de 2 experimentos independientes, n=4-5 ratones por grupo. *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$ para (d) mediante la prueba Mantel-Cox (prueba logrank).

2.2 Analizar el impacto de la ciclofosfamida en la eficacia de la ACT a largo plazo.

Los resultados anteriores indican que el régimen de linfodepleción con Cy puede ayudar a mejorar una ACT subóptima contra un desafío tumoral primario. No obstante, una de las limitaciones que tiene la ACT en los pacientes con cánceres metastásicos es que las células tumorales pierden la expresión del antígeno al cual se tiene como molécula blanco, y así logran escapar del reconocimiento del sistema inmune. Por esta razón, se ha decidido estudiar el efecto del régimen de linfodepleción con Cy a largo plazo, el cual consiste en un re-desafío tumoral con un modelo que ha perdido el antígeno diana de la terapia. De esta manera, solamente se analizará la participación del sistema inmune endógeno que sea capaz de reconocer a otros antígenos tumorales. En este sentido, los grupos de ratones que obtuvieron una regresión tumoral completa después de la ACT o ACT subóptima fueron re-desafiados con células B16F10, las cuales corresponden a un melanoma murino que no expresa el antígeno diana de la ACT.

Con el objetivo de evaluar el crecimiento normal de los tumores B16F10, se utilizó ratones controles que no han recibido ACT, en el cual se aprecia que los tumores crecen descontroladamente y de manera exponencial luego de la inyección de las células tumorales (*Figura 10a*). Por el contrario, en los ratones que recibieron ACT, los tumores B16F10 no son capaces de crecer después de la inyección de las células tumorales (*Figura 10b*), lo que sugiere que la ACT otorga una protección inmune endógena contra el re-desafío, probablemente mediado por linfocitos T CD8⁺ citotóxicos específicos contra antígenos tumorales. Inesperadamente, todos los ratones que recibieron un régimen de linfodepleción con Cy, tanto en ACT como en ACT subóptima, pierden la protección inmune endógena entregado por la ACT, ya que los tumores crecen descontroladamente después de la inyección con células tumorales B16F10 (*Figura 10c, 10d*). Añadido a esto, los ratones que no recibieron un régimen de linfodepleción con Cy pero obtuvieron la ACT, tienen una sobrevida de un 90% aproximadamente al menos hasta el día 40 después del re-desafío tumoral, en cambio, los grupos de ratones controles y los que recibieron Cy disminuyen su sobrevida a un 0% antes del día 24 después del re-desafío tumoral, lo que indica una disminución en la eficacia de la ACT a largo plazo (*Figura 10e*). A pesar de encontrar diferencias significativas en el análisis de sobrevida entre el grupo control y Cy + ACT o Cy + ACT subóptima (*Figura 10e*), la protección inmune antitumoral a largo plazo se pierde, ya que las células tumorales de los ratones que fueron linfodepletados con Cy son capaces de crecer descontroladamente (*Figura 10c, 10d*).

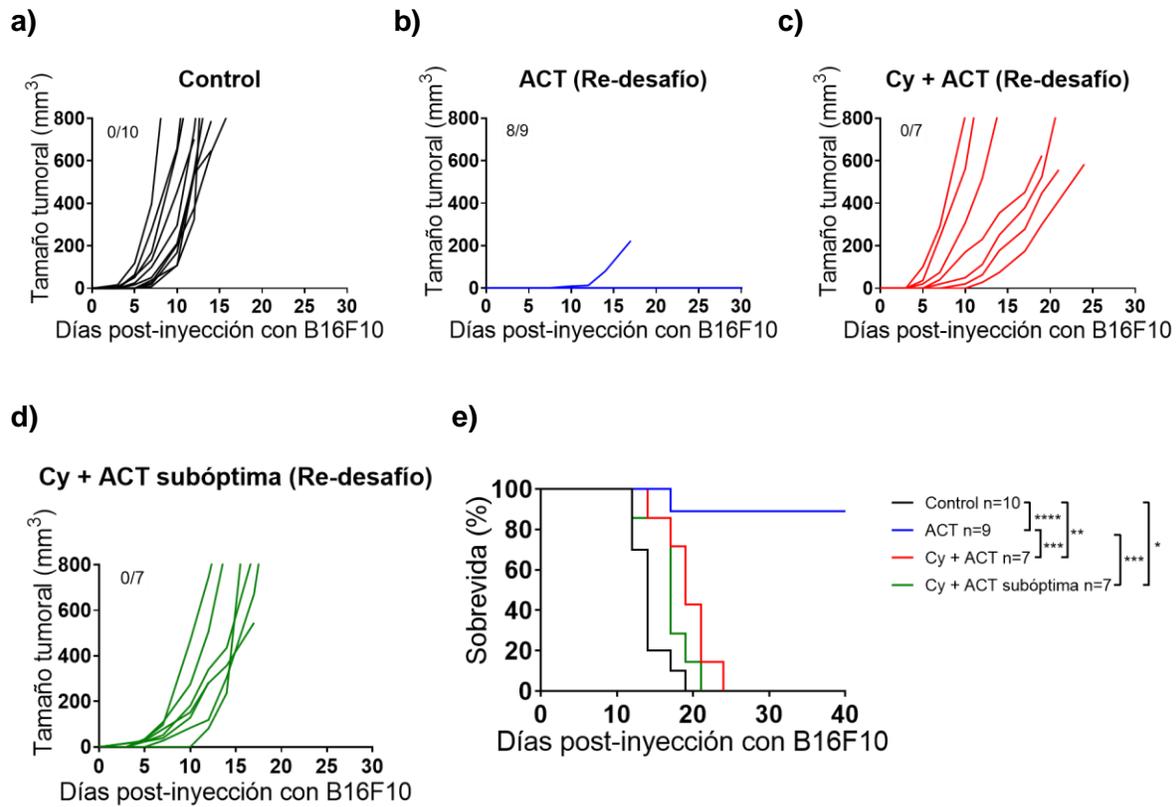


Figura 10: La ACT eficaz genera una protección inmune antitumoral a largo plazo, pero esta se ve abolida por el régimen de linfodepleción con ciclofosfamida. Ratones de la cepa C57BL/6J fueron desafiados mediante vía intradérmica con 1×10^6 células B16F10-OTI. Posteriormente, los ratones recibieron dos dosis de 300 mg/Kg de Cy los días 4 y 6 después del desafío tumoral. Luego, estos fueron transferidos con 1×10^6 o 5×10^5 de linfocitos OTI previamente activados *in vitro* (ACT o ACT subóptima). Finalmente, los ratones con regresión tumoral completa fueron re-desafiados en el flanco contrario vía intradérmica con 1×10^6 células B16F10. El volumen tumoral y sobrevida fue evaluado durante todo el transcurso del experimento. a-d Curvas individuales de crecimiento tumoral de los grupos control (a), ACT (b), Cy + ACT (c) y Cy + ACT subóptima (d). (e) Análisis de sobrevida a través del estimador Kaplan-Meier de los grupos evaluados en a-d. Datos agrupados de 2 experimentos independientes, n=4-5 ratones por grupo. *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$ para (e) mediante la prueba Mantel-Cox (prueba logrank).

8. Discusión

Las razones por las cuales las terapias celulares adoptivas (ACT) han demostrado una respuesta ineficiente en los pacientes con tumores sólidos y por qué estos mismos presentan resistencia contra las terapias todavía no se ha dilucidado por completo. Debido a esto, es sumamente importante entender cuáles son los mecanismos celulares y moleculares que permiten una respuesta inmune efectiva contra tumores sólidos en las ACT. En referencia a la clínica de los pacientes que reciben ACT, sigue siendo práctico utilizar un régimen de linfodepleción no mieloablativo, como se ha demostrado en varios estudios en pacientes con tumores sólidos (Kirtane et al, 2021; Zhao et al, 2022). Las principales razones por las cuales se utiliza un régimen de linfodepleción son: (1) eliminación de células inmunes supresoras, como linfocitos T CD4⁺ reguladores (Tregs) o células mieloides supresoras (MDSCs); (2) eliminación de la competición homeostática de citoquinas con otras células inmunes; (3) eliminación de células inmunes endógenas, generando un nicho tumoral apto para la llegada de las células transferidas (Antony et al, 2005; Gattinoni et al, 2005). Sin embargo, el impacto que puede tener sobre la efectividad de la ACT no se ha dilucidado por completo.

En esta tesis se determinó que un régimen de linfodepleción con ciclofosfamida (Cy) elimina a los linfocitos T CD8⁺ endógenos, tanto en el tumor como en el nódulo drenante de tumor (dLN). Esta eliminación es debido a que la ciclofosfamida impide la replicación celular a través de la alquilación del ADN (Dudley et al, 2005). Además, los linfocitos T CD8⁺ infiltrantes de tumor se han caracterizado muy bien en modelos murinos de tumores sólidos y en neoplasias humanas. Estos adquieren un programa de diferenciación disfuncional, denominados linfocitos T CD8⁺ exhaustos (Tex), debido a la estimulación crónica del TCR, lo cual desencadena un aumento en la expresión de receptores inhibitorios (principalmente PD-1 y TIM-3) (Khan et al, 2019). Dentro de los linfocitos Tex, las células que expresan el factor de transcripción TCF-1 representan una subpoblación progenitora exhausta (T_{pex}) que tiene un alto potencial proliferativo, y son sumamente importantes para mantener el repertorio de linfocitos Tex más diferenciados que carecen de TCF-1 y expresan altos niveles de PD-1 junto con moléculas citotóxicas como granzima B (T_{diff}) (Miller et al, 2019). En el modelo de melanoma murino B16F10-

OTI se encontró ambas subpoblaciones de linfocitos Tex en el tumor, en el cual los linfocitos T_{pex} (CD8⁺ PD-1⁺ GzmB⁻) expresan el factor de transcripción TCF-1 (dato no mostrado). En contraparte, los linfocitos T_{diff} (CD8⁺ PD-1⁺ GzmB⁺) pierden la expresión de TCF-1 y aumentan la expresión de GzmB, sugiriendo fuertemente que esta población ejerce un efecto citotóxico contra las células tumorales.

A pesar de estos antecedentes, durante los primeros días después del régimen de linfodepleción con Cy (4 días después de la última dosis de Cy) los linfocitos T CD8⁺ endógenos intratumorales son eliminados por completo, incluyendo todas las subpoblaciones de linfocitos Tex. Debido a que esta es una de las principales razones por la cual se realiza el régimen de linfodepleción, las células de la ACT se transfunden en los pacientes durante esta ventana terapéutica. Añadido a esto, se analizó los linfocitos T CD8⁺ endógenos intratumorales en un largo período de tiempo (27 días después de la última dosis de Cy) con el objetivo de evaluar su recuperación en el nicho tumoral y su capacidad de adquirir un perfil T_{pex} y T_{diff}. Los linfocitos T CD8⁺ endógenos son capaces de infiltrar nuevamente en el tumor, sin embargo, de forma inesperada, estos no son capaces de adquirir un perfil T_{pex} o T_{diff}, sugiriendo que estos no son capaces de ejercer su función citotóxica. Probablemente, estas células que se recuperan en el tumor corresponden a linfocitos T CD8⁺ de memoria, ya que después de un régimen de linfodepleción, en consecuencia, ocurre una transformación de linfocitos T vírgenes a linfocitos T de memoria (Tchao & Turka, 2012). Esta observación podría presentarse como un problema frente a nuevas mutaciones tumorales o a una recidiva tumoral, debido a que las ACT principalmente se limitan a un antígeno tumoral y el repertorio endógeno, los cuales pueden contener otros clones de TCR que reconozcan epítomos tumorales, no tienen la capacidad de diferenciarse a CTLs y eliminar células tumorales (Rohaán et al, 2019). Reforzando esta idea, estudios en tumores humanos de riñón sugieren que las respuestas efectivas de los pacientes dependen de la habilidad de los linfocitos progenitores PD-1⁺ TCF-1⁺ de estar en contacto cercano con células presentadoras de antígenos (APCs), como células dendríticas, lo que conlleva a una acumulación intratumoral de linfocitos T_{diff} y a una mejor sobrevida (Jansen et al, 2019). En tumores humanos de cáncer de pulmón, se ha descrito que linfocitos T CD8⁺ que tienen un perfil T_{diff} son altamente citotóxicos y se correlaciona con una mejor sobrevida y mejores respuestas de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (Clarke et al, 2019). Por lo tanto, la

subpoblación de linfocitos T_{diff} es crítica para ejercer una función citotóxica, mientras que la subpoblación progenitora T_{pex} es importante para una protección a largo plazo en tumores, y ambas son suprimidas con el régimen de linfodepleción con Cy.

Por otro lado, en este trabajo de investigación se encontró que el régimen de linfodepleción con Cy elimina a las cDC1, tanto en el tumor como en el dLN. Al igual que los linfocitos T_{CD8^+} endógenos, estas células son eliminadas debido a que la ciclofosfamida impide la replicación celular. Algunos estudios sugieren que el régimen de linfodepleción puede aumentar la activación de APCs, las cuales juegan un rol importante en regular a las células transferidas (Salem & Cole, 2010). Sin embargo, estos estudios no han considerado determinar los efectos del régimen de linfodepleción en un período más largo de tiempo. Al analizar las cDC1 tanto en el tumor como el dLN en un largo período de tiempo (27 días después de la última dosis de Cy) se encontró que esta población celular no es capaz de recuperarse después de un régimen de linfodepleción, lo cual sugiere que ante una respuesta subóptima a la ACT o una recidiva tumoral no se podrán presentar antígenos derivados de tumor a linfocitos T_{CD8^+} endógenos, es decir, no se podrá realizar presentación cruzada. Además, se ha demostrado que las cDC1 son importantes para mantener un reservorio de linfocitos T_{pex} específicos contra antígenos tumorales en los dLN, los cuales pueden migrar al tumor y diferenciarse a linfocitos T_{diff} , los cuales se caracterizan por ejercer una actividad citotóxica y eliminar a las células tumorales (Schenkel et al, 2021). Este hallazgo enfatiza aún más la importancia de las células endógenas en la respuesta inmune antitumoral, la cual es anulada por el régimen de linfodepleción con Cy.

En referencia a las células transferidas de la ACT, se ha reportado previamente que el régimen de linfodepleción con Cy permite una mejor infiltración o “engraftment” de los linfocitos transferidos en el nicho tumoral, sin embargo, no se ha estudiado en profundidad como la Cy podría afectar a las células transferidas. En el modelo murino B16F10-OTI los linfocitos OTI transferidos previamente activados *in vitro* se encuentran en distintos compartimentos, como en la sangre, en el dLN y en el tumor, pero estos pueden ejercer su acción citotóxica sólo cuando reconocen el antígeno presentado por las células tumorales. Interesantemente, a pesar de que en la sangre periférica los linfocitos

OTI representen una población muy acotada (aproximadamente el 1% de todas las células CD45⁺), el régimen de linfodepleción con Cy induce una expansión notable de los linfocitos transferidos, aumentando aproximadamente en 3 veces en comparación con el grupo no linfodepletado, indicando que probablemente estos linfocitos OTI tienen mayor disponibilidad de citoquinas homeostáticas, permitiendo así su proliferación. Además, cabe destacar que como los linfocitos OTI fueron previamente activados *in vitro*, estos presentan en su mayoría un fenotipo de memoria efectora (T_{em}), los cuales expresan receptores que les permiten ingresar a tejidos no linfoides, como el tumor (Sallusto et al, 1999). Por lo tanto, este incremento observado de los linfocitos OTI en sangre periférica en ratones linfodepletados podría reflejar un aumento en la infiltración intratumoral de las células transferidas.

Con esta última idea en mente, se analizó la infiltración de los linfocitos transferidos y los linfocitos T CD8⁺ endógenos en el tumor, con el objetivo de evaluar como un régimen de linfodepleción con Cy puede modular la infiltración de estas poblaciones celulares. En comparación a lo observado en sangre periférica, los linfocitos OTI transferidos representan un mayor porcentaje dentro de las células hematopoyéticas (alrededor del 4% de todas las células CD45⁺), indicando que estos pueden infiltrar en el tumor. Sorprendentemente, los linfocitos T CD8⁺ endógenos incrementan su infiltración intratumoral con la ACT, posiblemente a través de un mecanismo dependiente del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y de la presentación de antígenos por parte de las cDC1 (Figueroa et al, 2024). Además, de forma similar que en la sangre periférica, los linfocitos OTI transferidos en ratones tratados con Cy incrementan su infiltración intratumoral en al menos 3 veces en comparación con ratones no linfodepletados, indicando que el régimen de linfodepleción con Cy induce la expansión de las células transferidas en el tumor. A pesar de que un incremento de los linfocitos OTI en el tumor puede ser favorable para la efectividad de la ACT, la eliminación de las células inmunes endógenas inducido por el régimen de linfodepleción con Cy podría afectar a la protección inmune a largo plazo. Esto es debido a que en los ratones linfodepletados solamente existe la participación de los linfocitos OTI en la eliminación de las células tumorales, y estos carecen de un perfil T_{pex}, predomina un perfil T_{diff} y son eliminados rápidamente (Beltra et al, 2020).

Una primera aproximación para evaluar la eficacia de la ACT reside en utilizar modelos preclínicos, los cuales se utilizan ampliamente y permiten explorar la efectividad de una terapia a corto plazo (crecimiento tumoral) o a largo plazo (sobrevida). En esta tesis se desarrolló un modelo murino de ACT que desencadena una regresión tumoral completa en los individuos tratados, o, en otras palabras, un modelo eficaz de ACT. Esto nos permite comparar con otros modelos de ACT los cuales pueden ser beneficiosos o perjudiciales, como una ACT subóptima y/o un régimen de linfodepleción previo a la ACT. Interesantemente, el régimen de linfodepleción con Cy no afecta mayormente una ACT eficaz, en cambio, esta puede mejorar una terapia subóptima, lo cual refleja lo reportado previamente en pacientes que reciben ACT junto con un régimen de linfodepleción no mieloablativo (Kirtane et al, 2021). Según los resultados obtenidos previamente, se sugiere que el régimen de linfodepleción con Cy mejora la eficacia en una terapia subóptima porque esta induce un incremento en la infiltración de las células OTI transferidas, permitiendo así la eliminación completa del tumor.

Una estrategia experimental que se puede utilizar para evaluar la protección inmune frente a una recidiva tumoral o a una pérdida de antígeno diana es realizar un nuevo desafío tumoral, pero con las células tumorales parentales en el flanco contrario, las cuales carecen del antígeno diana de la ACT. Impresionantemente, una ACT eficaz produce una protección completa frente a un nuevo desafío tumoral, indicando que la ACT induce una respuesta inmune que es específica contra otros antígenos tumorales. A pesar de que en esta tesis no se exploró el origen de esta respuesta inmune específica, se ha sugerido fuertemente que las células que median la eliminación de las células tumorales son linfocitos T CD8⁺ endógenos específicos contra otros antígenos tumorales, los cuales son generados a través de un proceso denominado propagación de epítomos (*del inglés "antigen-spreading"*) (Menares et al, 2019; Walsh et al, 2019). Debido a este supuesto, se evaluó si la ACT es capaz de generar esta protección inmune en ratones previamente linfodepletados. Desafortunadamente, el régimen de linfodepleción con Cy perjudica la protección inmune frente al nuevo desafío tumoral con las células parentales independiente si es una ACT eficaz o una ACT subóptima, sugiriendo que frente a una recidiva tumoral o a una pérdida de antígeno diana las células cancerosas serán capaces de formar un nuevo tumor.

En la literatura se ha descrito ampliamente el rol que comprenden las células inmunes endógenas en la efectividad de las ACT y, además, su importancia en la protección antitumoral a largo plazo (Uno et al, 2006; Walsh et al, 2019; Schenkel et al, 2021). Por esta razón, algunos estudios se han enfocado en estimular el compartimento inmune endógeno, como el uso de virus oncolíticos, los cuales pueden mejorar la infiltración de tanto las células inmunes transferidas como las células inmunes endógenas. Esto permite transformar un “tumor helado” (*del inglés “cold tumor”*), caracterizado por una baja infiltración de células inmunes, a un “tumor caliente” (*del inglés “hot tumor”*), el cual contiene una mayor infiltración de células inmunes (Watanabe et al, 2018). Por otro lado, la estimulación de células dendríticas a través de moléculas activadoras, como el factor de crecimiento FLT3L, no solo incrementa la proliferación de células dendríticas convencionales de tipo 1 (cDC1) intratumorales, sino que también permite el reclutamiento de linfocitos T CD8⁺ endógenos específicos contra otros antígenos tumorales a través de un proceso de propagación de epítomos (Lai et al, 2020), recalcando aún más la importancia del compartimento endógeno en la efectividad de la ACT. Estas son solamente algunas de varias estrategias que se han postulado para mejorar la efectividad de la ACT en pacientes con tumores sólidos, las cuales podrían reemplazar o servir de adyuvante al régimen de linfodepleción no mieloablativo que se ha utilizado durante décadas sin mucho éxito en estos pacientes. Las inmunoterapias contra el cáncer, como la ACT, es un área del conocimiento que tiene aún muchos desafíos por superar.

9. Conclusiones

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que:

1. El régimen de linfodepleción con ciclofosfamida elimina prolongadamente a los linfocitos T CD8⁺ endógenos y células dendríticas convencionales de tipo 1, tanto en el tumor como en el nódulo linfático drenante de tumor.
2. El régimen de linfodepleción con ciclofosfamida perjudica la diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ endógenos hacia un perfil progenitor exhausto (T_{pex}) y terminalmente diferenciado (T_{diff}).
3. En un contexto de terapia celular adoptiva, el régimen de linfodepleción con ciclofosfamida elimina a los linfocitos T CD8⁺ endógenos e induce la expansión de los linfocitos transferidos, tanto en la sangre periférica como en el tumor.
4. El régimen de linfodepleción con ciclofosfamida mejora la eficacia de una terapia celular adoptiva subóptima.
5. El régimen de linfodepleción con ciclofosfamida perjudica la protección inmune a largo plazo inducida por la terapia celular adoptiva.

10. Referencias

1. Andersen, R., Donia, M., Ellebaek, E., Borch, T. H., Kongsted, P., Iversen, T. Z., Hölmich, L. R., Hendel, H. W., Met, Ö., Andersen, M. H., Thor Straten, P., & Svane, I. M. (2016). Long-Lasting Complete Responses in Patients with Metastatic Melanoma after Adoptive Cell Therapy with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and an Attenuated IL2 Regimen. *Clinical cancer research*, 22(15), 3734–3745. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1879>
2. Antony, P. A., Piccirillo, C. A., Akpınarlı, A., Finkelstein, S. E., Speiss, P. J., Surman, D. R., Palmer, D. C., Chan, C. C., Klebanoff, C. A., Overwijk, W. W., Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. (2005). CD8⁺ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4⁺ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *Journal of immunology*, 174(5), 2591–2601. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.5.2591>
3. Baird, J. R., Byrne, K. T., Lizotte, P. H., Toraya-Brown, S., Scarlett, U. K., Alexander, M. P., Sheen, M. R., Fox, B. A., Bzik, D. J., Bosenberg, M., Mullins, D. W., Turk, M. J., & Fiering, S. (2013). Immune-mediated regression of established B16F10 melanoma by intratumoral injection of attenuated *Toxoplasma gondii* protects against rechallenge. *Journal of immunology*, 190(1), 469–478. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201209>
4. Beltra, J. C., Manne, S., Abdel-Hakeem, M. S., Kurachi, M., Giles, J. R., Chen, Z., Casella, V., Ngiow, S. F., Khan, O., Huang, Y. J., Yan, P., Nzingha, K., Xu, W., Amaravadi, R. K., Xu, X., Karakousis, G. C., Mitchell, T. C., Schuchter, L. M., Huang, A. C., & Wherry, E. J. (2020). Developmental Relationships of Four Exhausted CD8⁺ T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms. *Immunity*, 52(5), 825–841.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.014>
5. Berwick, M., Buller, D. B., Cust, A., Gallagher, R., Lee, T. K., Meyskens, F., Pandey, S., Thomas, N. E., Veierød, M. B., & Ward, S. (2016). Melanoma Epidemiology and Prevention. *Cancer treatment and research*, 167, 17–49. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22539-5_2
6. Block, M. S. & Markovic, S. N. (2009). The Tumor/Immune Interface: Clinical Evidence of Cancer Immunosurveillance, Immunoediting and Immunosubversion. *American Journal of Immunology*, 5(1), 29-49. <https://doi.org/10.3844/ajisp.2009.29.49>
7. Bolognia, J., Jorizzo, J. L., & Schaffer, J. V. (2012). *Dermatology*. Elsevier Saunders.
8. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
9. Broz, M. L., Binnewies, M., Boldajipour, B., Nelson, A. E., Pollack, J. L., Erle, D. J., Barczak, A., Rosenblum, M. D., Daud, A., Barber, D. L., Amigorena, S., Van't Veer, L. J., Sperling, A. I., Wolf, D. M., & Krummel, M. F. (2014). Dissecting the tumor myeloid

- compartment reveals rare activating antigen-presenting cells critical for T cell immunity. *Cancer cell*, 26(5), 638–652. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.007>
10. Clarke, J., Panwar, B., Madrigal, A., Singh, D., Gujar, R., Wood, O., Chee, S. J., Eschweiler, S., King, E. V., Awad, A. S., Hanley, C. J., McCann, K. J., Bhattacharyya, S., Woo, E., Alzetani, A., Seumois, G., Thomas, G. J., Ganesan, A. P., Friedmann, P. S., Sanchez-Elsner, T., ... Vijayanand, P. (2019). Single-cell transcriptomic analysis of tissue-resident memory T cells in human lung cancer. *The Journal of experimental medicine*, 216(9), 2128–2149. <https://doi.org/10.1084/jem.20190249>
 11. Coley, W. B. (1893). The Treatment of Malignant Tumors by Repeated Inoculations of Erysipelas: With a Report of Ten Original Cases. *The American Journal of the Medical Sciences*, 105, 487-511.
 12. Corrie, P., Hategan, M., Fife, K., & Parkinson, C. (2014). Management of melanoma. *British medical bulletin*, 111(1), 149–162. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldu019>
 13. Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Yang, J. C., Sherry, R. M., Topalian, S. L., Restifo, N. P., Royal, R. E., Kammula, U., White, D. E., Mavroukakis, S. A., Rogers, L. J., Gracia, G. J., Jones, S. A., Mangiameli, D. P., Pelletier, M. M., Gea-Banacloche, J., Robinson, M. R., Berman, D. M., Filie, A. C., Abati, A., ... Rosenberg, S. A. (2005). Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology*, 23(10), 2346–2357. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.00.240>
 14. Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21(2), 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017>
 15. Edwards, J., Wilmott, J. S., Madore, J., Gide, T. N., Quek, C., Tasker, A., Ferguson, A., Chen, J., Hewavisenti, R., Hersey, P., Gebhardt, T., Weninger, W., Britton, W. J., Saw, R. P. M., Thompson, J. F., Menzies, A. M., Long, G. V., Scolyer, R. A., & Palendira, U. (2018). CD103⁺ Tumor-Resident CD8⁺ T Cells Are Associated with Improved Survival in Immunotherapy-Naïve Melanoma Patients and Expand Significantly During Anti-PD-1 Treatment. *Clinical cancer research*, 24(13), 3036–3045. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2257>
 16. Eggermont, A. M., Chiarion-Sileni, V., Grob, J. J., Dummer, R., Wolchok, J. D., Schmidt, H., Hamid, O., Robert, C., Ascierto, P. A., Richards, J. M., Lebbé, C., Ferraresi, V., Smylie, M., Weber, J. S., Maio, M., Bastholt, L., Mortier, L., Thomas, L., Tahir, S., Hauschild, A., ... Testori, A. (2016). Prolonged Survival in Stage III Melanoma with Ipilimumab Adjuvant Therapy. *The New England journal of medicine*, 375(19), 1845–1855. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611299>
 17. 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), 217–224. <https://doi.org/10.1038/labani.254>
18. Figueroa, D., Vega-Medina, J., Hernández-Oliveras, A., Gálvez-Cancino, F., Ardiles, F., Flores, F., Hidalgo, S., López, X., González, H., Osorio, F., Borgna, V., Lladser, A. (2024). Long-term efficacy of adoptive cell therapy is determined by host CD8⁺ T cells and undermined by lymphodepleting preconditioning. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.05.16.594554>
 19. 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. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1442163>
 20. Garon, E. B., Rizvi, N. A., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A. S., Eder, J. P., Patnaik, A., Aggarwal, C., Gubens, M., Horn, L., Carcereny, E., Ahn, M. J., Felip, E., Lee, J. S., Hellmann, M. D., Hamid, O., Goldman, J. W., Soria, J. C., Dolled-Filhart, M., Rutledge, R. Z., ... KEYNOTE-001 Investigators (2015). Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*, 372(21), 2018–2028. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1501824>
 21. Gasparri, M. L., Ruscito, I., Taghavi, K., Farooqi, A. A., Papadia, A., Focaccetti, C., Barnaba, V., Panici, P. B., & Mueller, M. D. (2017). The immunobiology of cancer: From tumor escape to cancer immunoediting towards immunotherapy in gynecologic oncology. *Molecular Oncology: Underlying Mechanisms and Translational Advancements*, 193–204. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53082-6_9
 22. Gattinoni, L., Finkelstein, S. E., Klebanoff, C. A., Antony, P. A., Palmer, D. C., Spiess, P. J., Hwang, L. N., Yu, Z., Wrzesinski, C., Heimann, D. M., Surh, C. D., Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. (2005). Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8⁺ T cells. *The Journal of experimental medicine*, 202(7), 907–912. <https://doi.org/10.1084/jem.20050732>
 23. Goydos, J. S., & Shoen, S. L. (2016). Acral Lentiginous Melanoma. *Cancer treatment and research*, 167, 321–329. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22539-5_14
 24. Gros, A., Robbins, P. F., Yao, X., Li, Y. F., Turcotte, S., Tran, E., Wunderlich, J. R., Mixon, A., Farid, S., Dudley, M. E., Hanada, K., Almeida, J. R., Darko, S., Douek, D. C., Yang, J. C., & Rosenberg, S. A. (2014). PD-1 identifies the patient-specific CD8⁺ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *The Journal of clinical investigation*, 124(5), 2246–2259. <https://doi.org/10.1172/JCI73639>
 25. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

26. Harimoto, H., Shimizu, M., Nakagawa, Y., Nakatsuka, K., Wakabayashi, A., Sakamoto, C., & Takahashi, H. (2013). Inactivation of tumor-specific CD8⁺ CTLs by tumor-infiltrating tolerogenic dendritic cells. *Immunology and Cell Biology*, *91*(10), 665. <https://doi.org/10.1038/icb.2013.82>
27. Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., Akerley, W., van den Eertwegh, A. J., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbé, C., Peschel, C., ... Urban, W. J. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine*, *363*(8), 711–723. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>
28. Hosen N. (2019). Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for Multiple Myeloma. *Cancers*, *11*(12), 2024. <https://doi.org/10.3390/cancers11122024>
29. Huang, J., Khong, H. T., Dudley, M. E., El-Gamil, M., Li, Y. F., Rosenberg, S. A., & Robbins, P. F. (2005). Survival, persistence, and progressive differentiation of adoptively transferred tumor-reactive T cells associated with tumor regression. *Journal of immunotherapy*, *28*(3), 258–267. <https://doi.org/10.1097/01.cji.0000158855.92792.7a>
30. Jansen, C. S., Prokhnivska, N., Master, V. A., Sanda, M. G., Carlisle, J. W., Bilen, M. A., Cardenas, M., Wilkinson, S., Lake, R., Sowalsky, A. G., Valanparambil, R. M., Hudson, W. H., McGuire, D., Melnick, K., Khan, A. I., Kim, K., Chang, Y. M., Kim, A., Filson, C. P., Alemozaffar, M., ... Kissick, H. (2019). An intra-tumoral niche maintains and differentiates stem-like CD8 T cells. *Nature*, *576*(7787), 465–470. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1836-5>
31. Johnson, L. A., Morgan, R. A., Dudley, M. E., Cassard, L., Yang, J. C., Hughes, M. S., Kammula, U. S., Royal, R. E., Sherry, R. M., Wunderlich, J. R., Lee, C. C., Restifo, N. P., Schwarz, S. L., Cogdill, A. P., Bishop, R. J., Kim, H., Brewer, C. C., Rudy, S. F., VanWaes, C., Davis, J. L., ... Rosenberg, S. A. (2009). Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*, *114*(3), 535–546. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-211714>
32. June, C. H., Riddell, S. R., & Schumacher, T. N. (2015). Adoptive cellular therapy: a race to the finish line. *Science translational medicine*, *7*(280), 280ps7. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa3643>
33. Kallies, A., Zehn, D., & Utzschneider, D. T. (2020). Precursor exhausted T cells: key to successful immunotherapy?. *Nature reviews. Immunology*, *20*(2), 128–136. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0223-7>
34. Karagiannis, G. S., Condeelis, J. S., & Oktay, M. H. (2019). Chemotherapy-Induced Metastasis: Molecular Mechanisms, Clinical Manifestations, Therapeutic Interventions. *Cancer research*, *79*(18), 4567–4576. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-1147>

35. Kedl, R. M., Lindsay, R. S., Finlon, J. M., Lucas, E. D., Friedman, R. S., & Tamburini, B. A. J. (2017). Migratory dendritic cells acquire and present lymphatic endothelial cell-archived antigens during lymph node contraction. *Nature communications*, *8*(1), 2034. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02247-z>
36. Khan, O., Giles, J. R., McDonald, S., Manne, S., Ngiow, S. F., Patel, K. P., Werner, M. T., Huang, A. C., Alexander, K. A., Wu, J. E., Attanasio, J., Yan, P., George, S. M., Bengsch, B., Staube, R. P., Donahue, G., Xu, W., Amaravadi, R. K., Xu, X., Karakousis, G. C., ... Wherry, E. J. (2019). TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8⁺ T cell exhaustion. *Nature*, *571*(7764), 211–218. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1325-x>
37. Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, *121*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x>
38. Kirtane, K., Elmariah, H., Chung, C. H., & Abate-Daga, D. (2021). Adoptive cellular therapy in solid tumor malignancies: review of the literature and challenges ahead. *Journal for immunotherapy of cancer*, *9*(7), e002723. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-002723>
39. Kochenderfer, J. N., Somerville, R. P. T., Lu, T., Yang, J. C., Sherry, R. M., Feldman, S. A., McIntyre, L., Bot, A., Rossi, J., Lam, N., & Rosenberg, S. A. (2017). Long-Duration Complete Remissions of Diffuse Large B Cell Lymphoma after Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy. *Molecular therapy*, *25*(10), 2245–2253. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.07.004>
40. Lai, J., Mardiana, S., House, I. G., Sek, K., Henderson, M. A., Giuffrida, L., Chen, A. X. Y., Todd, K. L., Petley, E. V., Chan, J. D., Carrington, E. M., Lew, A. M., Solomon, B. J., Trapani, J. A., Kedzierska, K., Evrard, M., Vervoort, S. J., Waithman, J., Darcy, P. K., & Beavis, P. A. (2020). Adoptive cellular therapy with T cells expressing the dendritic cell growth factor Flt3L drives epitope spreading and antitumor immunity. *Nature immunology*, *21*(8), 914–926. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0676-7>
41. Lau, J., Cheung, J., Navarro, A., Lianoglou, S., Haley, B., Totpal, K., Sanders, L., Koeppen, H., Caplazi, P., McBride, J., Chiu, H., Hong, R., Grogan, J., Javinal, V., Yauch, R., Irving, B., Belvin, M., Mellman, I., Kim, J. M., & Schmidt, M. (2017). Tumour and host cell PD-L1 is required to mediate suppression of anti-tumour immunity in mice. *Nature communications*, *8*, 14572. <https://doi.org/10.1038/ncomms14572>
42. Maier, B., Leader, A. M., Chen, S. T., Tung, N., Chang, C., LeBerichel, J., Chudnovskiy, A., Maskey, S., Walker, L., Finnigan, J. P., Kirkling, M. E., Reizis, B., Ghosh, S., D'Amore, N. R., Bhardwaj, N., Rothlin, C. V., Wolf, A., Flores, R., Marron, T., Rahman, A. H., ... Merad, M. (2020). A conserved dendritic-cell regulatory program limits antitumour immunity. *Nature*, *580*(7802), 257–262. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2134-y>

43. Maurice, N. J., McElrath, M. J., Andersen-Nissen, E., Frahm, N., & Prlic, M. (2019). CXCR3 enables recruitment and site-specific bystander activation of memory CD8⁺ T cells. *Nature communications*, *10*(1), 4987. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12980-2>
44. McKenna, J. K., Florell, S. R., Goldman, G. D., & Bowen, G. M. (2006). Lentigo Maligna/Lentigo maligna melanoma: Current state of diagnosis and treatment. *Dermatologic Surgery*, *32*(4), 493–504. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2006.32102.x>
45. Menares, E., Gálvez-Cancino, F., Cáceres-Morgado, P., Ghorani, E., López, E., Díaz, X., Saavedra-Almarza, J., Figueroa, D. A., Roa, E., Quezada, S. A., & Lladser, A. (2019). Tissue-resident memory CD8⁺ T cells amplify anti-tumor immunity by triggering antigen spreading through dendritic cells. *Nature communications*, *10*(1), 4401. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12319-x>
46. Menzies, S. W., Moloney, F. J., Byth, K., Avramidis, M., Argenziano, G., Zalaudek, I., Braun, R. P., Malvehy, J., Puig, S., Rabinovitz, H. S., Oliviero, M., Cabo, H., Bono, R., Pizzichetta, M. A., Claeson, M., Gaffney, D. C., Soyer, H. P., Stanganelli, I., Scolyer, R. A., Guitera, P., ... Kreusch, J. (2013). Dermoscopic evaluation of nodular melanoma. *JAMA dermatology*, *149*(6), 699–709. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2013.2466>
47. Miller, A. J., & Mihm, M. C., Jr (2006). Melanoma. *The New England journal of medicine*, *355*(1), 51–65. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052166>
48. Miller, B. C., Sen, D. R., Al Aboosy, R., Bi, K., Virkud, Y. V., LaFleur, M. W., Yates, K. B., Lako, A., Felt, K., Naik, G. S., Manos, M., Gjini, E., Kuchroo, J. R., Ishizuka, J. J., Collier, J. L., Griffin, G. K., Maleri, S., Comstock, D. E., Weiss, S. A., Brown, F. D., ... Haining, W. N. (2019). Subsets of exhausted CD8⁺ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nature immunology*, *20*(3), 326–336. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0312-6>
49. Ministerio de Salud. Departamento de Epidemiología. Informe de Vigilancia de Cáncer. Análisis de Mortalidad. Década 2009-2018. Chile 2020.
50. O'Donnell, J. S., Teng, M. W. L., & Smyth, M. J. (2019). Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *16*(3), 151–167. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0142-8>
51. Oiseth, S., & Aziz, M. (2017). Cancer immunotherapy: A brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, *3*(10), 250–61. <http://dx.doi.org/10.20517/2394-4722.2017.41>
52. Olszanski, A. J. (2015). Principles of immunotherapy. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, *13*(5S), 670–672. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2015.0199>
53. Parra, S., Petermann, F., Martínez, M., Leiva, A., Troncoso, C., Ulloa, N., Díaz, X. & Celis, C. (2020). Cáncer en Chile y en el mundo: una mirada actual y su futuro escenario epidemiológico. *Revista médica de Chile*, *148*(10), 1489-1495. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872020001001489>

54. Porter, D. L., Levine, B. L., Kalos, M., Bagg, A., & June, C. H. (2011). Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *The New England journal of medicine*, *365*(8), 725–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103849>
55. Prickett, T. D., Crystal, J. S., Cohen, C. J., Pasetto, A., Parkhurst, M. R., Gartner, J. J., Yao, X., Wang, R., Gros, A., Li, Y. F., El-Gamil, M., Trebska-McGowan, K., Rosenberg, S. A., & Robbins, P. F. (2016). Durable Complete Response from Metastatic Melanoma after Transfer of Autologous T Cells Recognizing 10 Mutated Tumor Antigens. *Cancer immunology research*, *4*(8), 669–678. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0215>
56. Rizvi, N. A., Hellmann, M. D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J. J., Lee, W., Yuan, J., Wong, P., Ho, T. S., Miller, M. L., Rekhtman, N., Moreira, A. L., Ibrahim, F., Bruggeman, C., Gasmi, B., Zappasodi, R., Maeda, Y., Sander, C., Garon, E. B., ... Chan, T. A. (2015). Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*, *348*(6230), 124–128. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1348>
57. Rohaan, M. W., Wilgenhof, S., & Haanen, J. B. A. G. (2019). Adoptive cellular therapies: the current landscape. *Virchows Archiv*, *474*(4), 449–461. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2484-0>
58. Rooney, M. S., Shukla, S. A., Wu, C. J., Getz, G., & Hachohen, N. (2015). Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell*, *160*(1-2), 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.033>
59. Russell, J. H., & Ley, T. J. (2002). Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology*, *20*, 323–370. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100201.131730>
60. Salem, M. L., & Cole, D. J. (2010). Dendritic cell recovery post-lymphodepletion: a potential mechanism for anti-cancer adoptive T cell therapy and vaccination. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, *59*(3), 341–353. <https://doi.org/10.1007/s00262-009-0792-6>
61. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., & Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, *401*(6754), 708–712. <https://doi.org/10.1038/44385>
62. 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. <https://doi.org/10.1126/science.1254536>
63. Schenkel, J. M., Herbst, R. H., Canner, D., Li, A., Hillman, M., Shanahan, S. L., Gibbons, G., Smith, O. C., Kim, J. Y., Westcott, P., Hwang, W. L., Freed-Pastor, W. A., Eng, G., Cuoco, M. S., Rogers, P., Park, J. K., Burger, M. L., Rozenblatt-Rosen, O., Cong, L., Pauken, K. E., ... Jacks, T. (2021). Conventional type I dendritic cells maintain a reservoir of proliferative tumor-antigen specific TCF-1⁺ CD8⁺ T cells in tumor-draining lymph nodes. *Immunity*, *54*(10), 2338–2353.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.08.026>
64. Scott, A. C., Dündar, F., Zumbo, P., Chandran, S. S., Klebanoff, C. A., Shakiba, M., Trivedi, P., Menocal, L., Appleby, H., Camara, S., Zamarin, D., Walther, T., Snyder, A., Femia, M.

- R., Comen, E. A., Wen, H. Y., Hellmann, M. D., Anandasabapathy, N., Liu, Y., Altorki, N. K., ... Schietinger, A. (2019). TOX is a critical regulator of tumour-specific T cell differentiation. *Nature*, *571*(7764), 270–274. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1324-y>
65. Sharpe, A. H., & Pauken, K. E. (2018). The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nature reviews. Immunology*, *18*(3), 153–167. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.108>
66. Siddiqui, I., Schaeuble, K., Chennupati, V., Fuertes Marraco, S. A., Calderon-Copete, S., Pais Ferreira, D., Carmona, S. J., Scarpellino, L., Gfeller, D., Pradervand, S., Luther, S. A., Speiser, D. E., & Held, W. (2019). Intratumoral Tcf1+PD-1+CD8+ T Cells with Stem-like Properties Promote Tumor Control in Response to Vaccination and Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Immunity*, *50*(1), 195–211.e10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.12.021>
67. Sim, M. J. W., Lu, J., Spencer, M., Hopkins, F., Tran, E., Rosenberg, S. A., Long, E. O., & Sun, P. D. (2020). High-affinity oligoclonal TCRs define effective adoptive T cell therapy targeting mutant KRAS-G12D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(23), 12826–12835. <https://doi.org/10.1073/pnas.1921964117>
68. Slansky, J. E., Rattis, F. M., Boyd, L. F., Fahmy, T., Jaffee, E. M., Schneck, J. P., Margulies, D. H., & Pardoll, D. M. (2000). Enhanced antigen-specific antitumor immunity with altered peptide ligands that stabilize the MHC-peptide-TCR complex. *Immunity*, *13*(4), 529–538. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)00052-2](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)00052-2)
69. Stevanović, S., Helman, S. R., Wunderlich, J. R., Langhan, M. M., Doran, S. L., Kwong, M. L. M., Somerville, R. P. T., Klebanoff, C. A., Kammula, U. S., Sherry, R. M., Yang, J. C., Rosenberg, S. A., & Hinrichs, C. S. (2019). A Phase II Study of Tumor-infiltrating Lymphocyte Therapy for Human Papillomavirus-associated Epithelial Cancers. *Clinical cancer research*, *25*(5), 1486–1493. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2722>
70. Tcho, N. K., & Turka, L. A. (2012). Lymphodepletion and homeostatic proliferation: implications for transplantation. *American journal of transplantation*, *12*(5), 1079–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04008.x>
71. Uno, T., Takeda, K., Kojima, Y., Yoshizawa, H., Akiba, H., Mittler, R. S., Gejyo, F., Okumura, K., Yagita, H., & Smyth, M. J. (2006). Eradication of established tumors in mice by a combination antibody-based therapy. *Nature medicine*, *12*(6), 693–698. <https://doi.org/10.1038/nm14054>
72. Vinay, D. S., Ryan, E. P., Pawelec, G., Talib, W. H., Stagg, J., Elkord, E., Lichtor, T., Decker, W. K., Whelan, R. L., Kumara, H. M. C. S., Signori, E., Honoki, K., Georgakilas, A. G., Amin, A., Helferich, W. G., Boosani, C. S., Guha, G., Ciriolo, M. R., Chen, S., Mohammed, S. I., ... Kwon, B. S. (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in cancer biology*, *35* Suppl, S185–S198. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.004>

73. Walsh, S. R., Simovic, B., Chen, L., Bastin, D., Nguyen, A., Stephenson, K., Mandur, T. S., Bramson, J. L., Lichty, B. D., & Wan, Y. (2019). Endogenous T cells prevent tumor immune escape following adoptive T cell therapy. *The Journal of clinical investigation*, *129*(12), 5400–5410. <https://doi.org/10.1172/JCI126199>
74. Watanabe, K., Luo, Y., Da, T., Guedan, S., Ruella, M., Scholler, J., Keith, B., Young, R. M., Engels, B., Sorsa, S., Siurala, M., Havunen, R., Tähtinen, S., Hemminki, A., & June, C. H. (2018). Pancreatic cancer therapy with combined mesothelin-redirected chimeric antigen receptor T cells and cytokine-armed oncolytic adenoviruses. *JCI insight*, *3*(7), e99573. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.99573>
75. Wolchok, J. D., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Rutkowski, P., Grob, J. J., Cowey, C. L., Lao, C. D., Wagstaff, J., Schadendorf, D., Ferrucci, P. F., Smylie, M., Dummer, R., Hill, A., Hogg, D., Haanen, J., Carlino, M. S., Bechter, O., Maio, M., Marquez-Rodas, I., Guidoboni, M., ... Larkin, J. (2017). Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *The New England journal of medicine*, *377*(14), 1345–1356. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709684>
76. Wylie, B., Chee, J., Forbes, C. A., Booth, M., Stone, S. R., Buzzai, A., Abad, A., Foley, B., Cruickshank, M. N., & Waithman, J. (2019). Acquired resistance during adoptive cell therapy by transcriptional silencing of immunogenic antigens. *Oncoimmunology*, *8*(8), 1609874. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1609874>
77. Yao, C., Sun, H. W., Lacey, N. E., Ji, Y., Moseman, E. A., Shih, H. Y., Heuston, E. F., Kirby, M., Anderson, S., Cheng, J., Khan, O., Handon, R., Reilley, J., Fioravanti, J., Hu, J., Gossa, S., Wherry, E. J., Gattinoni, L., McGavern, D. B., O'Shea, J. J., ... Wu, T. (2019). Single-cell RNA-seq reveals TOX as a key regulator of CD8⁺ T cell persistence in chronic infection. *Nature immunology*, *20*(7), 890–901. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0403-4>
78. Yost, K. E., Satpathy, A. T., Wells, D. K., Qi, Y., Wang, C., Kageyama, R., McNamara, K. L., Granja, J. M., Sarin, K. Y., Brown, R. A., Gupta, R. K., Curtis, C., Bucktrout, S. L., Davis, M. M., Chang, A. L. S., & Chang, H. Y. (2019). Clonal replacement of tumor-specific T cells following PD-1 blockade. *Nature medicine*, *25*(8), 1251–1259. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0522-3>
79. Zhao, Y., Deng, J., Rao, S., Guo, S., Shen, J., Du, F., Wu, X., Chen, Y., Li, M., Chen, M., Li, X., Li, W., Gu, L., Sun, Y., Zhang, Z., Wen, Q., Xiao, Z., & Li, J. (2022). Tumor Infiltrating Lymphocyte (TIL) Therapy for Solid Tumor Treatment: Progressions and Challenges. *Cancers*, *14*(17), 4160. <https://doi.org/10.3390/cancers14174160>