



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**LAS PORINAS DE *SALMONELLA* TYPHI SON UN ADYUVANTE QUE INDUCE
LINFOCITOS T DE MEMORIA RESIDENTE DE TEJIDO CON UN FENOTIPO
PROGENITOR EXHAUSTO EN UN MODELO DE MELANOMA EN RATÓN**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
RICARDO ANDRÉS LEÓN LETELIER**

**DIRECTORA DE TESIS
DRA. LAURA C. BONIFAZ ALFONZO
FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR
DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

CIUDAD DE MÉXICO, MAYO DE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue realizado bajo la tutoría de la Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonzo en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMIQ), ubicado en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social.

Este proyecto se realizó con el financiamiento del Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (R-2019-785-051 FIS/IMSS/PROT/PRIO/19/125 y R-2015-785-008 FIS/IMSS/PROT/G16/ 1606). Durante el desarrollo del proyecto de tesis – el sustentante – fue alumno del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), siendo becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el número de registro 631989.

Se agradece al Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM y al Instituto Nacional de Salud Pública, Secretaría de Salud, en especial a MVZ M. en C. Anayáztzin Paulina Heredia Antúnez, por el cuidado de los animales. Se agradece al Dr. José Carlos Crispín del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por proveer ratones OT-I x CD45.1⁺, a la Dra. Gloria Soldevila del Instituto de Investigación Biomédica, UNAM por proveer ratones OT-II x CD45.1⁺. Al Dr. Constantino López Macías por proveer las Porinas de *Salmonella* Typhi. Finalmente se agradece al Laboratorio de Citometría de Flujo del Centro de Instrumentos de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS, en especial a la cDr. Jessica Lakshmi Prieto Chávez.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nadie a mi tutora, la Dra. Laura Bonifaz, por darme la oportunidad trabajar bajo su dirección desde la Estancia Estudiantil hasta hoy. Muchas gracias por la revisión de este proyecto y todos los demás trabajos de mi doctorado, por lo que estaré siempre agradecido.

Al próximo Dr. Enrique Huanosta Murillo por su gran amistad, fructíferas discusiones, excelentes sesiones de música, cooperación y sus inmunofluorescencias.

A la cDr. Araceli Tepale Segura por su gran amistad, innegable generosidad, crucial cooperación y su excelente trabajo en tejido al son de Chayanne y Cristian Castro.

A la QFB Cristina Aguilera Flores por su amistad, charlas políticas, crítica y cooperación en este proyecto junto a la QFB Sarai De León Rodríguez y a la Dra. Alejandra Mantilla.

Al Dr. Oscar Badillo Godinez por su amistad, recetas veganas, recomendaciones y ayuda en la obtención de TILs

Al próximo QFB Daniel Castro Medina por su gran asistencia en este trabajo.

Al Dr. Ezequiel Fuentes Pananá por estar presente en casi todos los artículos que publiqué en el doctorado, en especial por su dirección en la de revisión

cDr. Jessica Lakshmi Prieto Chávez por su amistad y largas sesiones en el Centro de Instrumentos, ya sea pasando tubos o hablando de la vida.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Ana Clara, Paty, Octavio, Luis Angel, Lorena, Panda, Andrés, Luzma, Gibrán, Alberto, Elizabeth y Brenda, por los varios congresos e historias que compartimos.

Un especial agradecimiento por el infinito apoyo de mi esposa, quién siempre me ayudó a que mi trabajo dentro y fuera del laboratorio fuese más fácil.

También agradezco a mi papá por siempre creer en mi, por sus pocos pero inolvidables consejos; así también a mis hermanos y familia.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| LISTAS DE ABREVIATURAS | 7 |
| RESUMEN | 8 |
| ABSTRACT | 9 |
| MARCO TEÓRICO | |
| 1. <i>Melanoma es un cáncer agresivo e inmunogénico</i> | 10 |
| 1.1. <i>La quimioterapia y la inmunoterapia en melanoma</i> | 11 |
| 1.2. <i>La inmunización como estrategia de inmunoterapia en melanoma</i> | 13 |
| 2. <i>Las Porinas de Salmonella Typhi como potencial adyuvante en un modelo tumoral</i> | 15 |
| 3. <i>La subunidad B no tóxica de la toxina del cólera como adyuvante en un modelo tumoral</i> | 16 |
| 4. <i>La participación de linfocitos T en la respuesta antitumoral en melanoma</i> | 17 |
| 4.1. <i>Diferenciación y participación de los linfocitos T de memoria residente de tejido en la respuesta inmune contra melanoma</i> | 18 |
| 4.2. <i>Diferenciación y participación de los linfocitos T exhaustos en la respuesta inmune contra melanoma</i> | 21 |
| JUSTIFICACIÓN | 23 |
| PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | 25 |
| HIPÓTESIS | 25 |
| OBJETIVOS | 26 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 27 |
| RESULTADOS | |
| 1. <i>La inmunización con Porinas induce un control profiláctico y terapéutico contra melanoma</i> | 35 |
| 2. <i>Las Porinas generan una respuesta de linfocitos T de memoria circulante y residente de tejido</i> | 37 |
| 3. <i>Las Porinas inducen linfocitos Trm funcionales que controlan el crecimiento tumoral</i> | 43 |

| | |
|---|----|
| 4. <i>Las Porinas inducen linfocitos Trm infiltrantes de tumor que protegen contra un melanoma que expresa antígenos naturales</i> | 46 |
| 5. <i>Las Porinas inducen una protección tumoral más eficiente comparado con la subunidad B de la toxina del cólera</i> | 49 |
| 6. <i>Las Porinas inducen linfocitos Trm con un fenotipo progenitor exhausto que correlaciona con la protección tumoral</i> | 54 |
| 7. <i>Los linfocitos Trm con un fenotipo progenitor exhausto inducidos por las Porinas correlacionan con la cooperación de la inmunoterapia anti-PD-1</i> | 61 |
| DISCUSIÓN | 64 |
| CONCLUSIONES | 79 |
| BIBLIOGRAFÍA | 81 |
| FIGURAS | |
| Figura 1. Las Porinas como adyuvante inducen una respuesta profiláctica y terapéutica anti-tumoral efectiva..... | 36 |
| Figura 2. La inmunización con Porinas induce una expansión más eficiente de linfocitos T CD8 ⁺ que de linfocitos T CD4 ⁺ | 38 |
| Figura 3. La inmunización con Porinas induce linfocitos T de memoria circulante y linfocitos T productores de IFN- γ | 39 |
| Figura 4. Las Porinas inducen eficientemente linfocitos T CD8 ⁺ de memoria residente de tejido..... | 41 |
| Figura 5. Las Porinas inducen linfocitos CD4 ⁺ Trm..... | 42 |
| Figura 6. La inmunización con Porinas induce una respuesta Trm eficiente que correlaciona con el control tumoral..... | 44 |
| Figura 7. Las Porinas inducen linfocitos CD8 ⁺ Trm funcionales resistentes a la eliminación sistémica mediada por anticuerpos..... | 45 |
| Figura 8. La inmunización con Porinas induce linfocitos CD8 ⁺ Trm que responden a antígenos naturales de melanoma que controlan el crecimiento..... | 47 |
| Figura 9. Las Porinas inducen linfocitos CD4 ⁺ Trm en un modelo de antígenos naturales de melanoma..... | 48 |

| | |
|---|----|
| Figura 10. Las Porinas como adyuvante controla mejor el crecimiento tumoral que la subunidad B de la toxina de cólera..... | 50 |
| Figura 11. Las Porinas inducen linfocitos OT-I Trm con baja expresión de PD-1 comparado con la CTB..... | 51 |
| Figura 12. Las Porinas inducen linfocitos OT-II Trm con mayor expresión de PD-1 comparado con la CTB..... | 52 |
| Figura 13. Las Porinas y CTB inducen linfocitos T TIM-3 ⁺ PD-1 ⁺ CD8 ⁺ en el estroma tumoral..... | 55 |
| Figura 14. Las Porinas y CTB inducen linfocitos T TIM-3 ⁺ PD-1 ⁺ CD8 ⁺ funcionales en el estroma tumoral..... | 56 |
| Figura 15. La inmunización con Porinas induce linfocitos CD8 ⁺ Trm con un fenotipo terminalmente exhausto..... | 58 |
| Figura 16. Las Porinas inducen linfocitos TCF-1 ⁺ PD-1 ⁺ CD8 ⁺ Trm en el estroma tumoral. | 59 |
| Figura 17. Las Porinas inducen linfocitos CD8 ⁺ Trm con un fenotipo progenitor exhausto en el estroma tumoral..... | 60 |
| Figura 18. La presencia de linfocitos CD8 ⁺ Trm con un fenotipo progenitor exhausto correlaciona con la respuesta a la inmunoterapia anti-PD-1..... | 62 |
| Figura 19. Los linfocitos T CD8 ⁺ terminalmente exhaustos inducidos por las Porinas no se modifican con el bloqueo de PD-1..... | 63 |
| Figura 20. Modelo de protección contra el melanoma con la estrategia de inmunización utilizando a las Porinas de <i>Salmonella</i> Typhi..... | 78 |

LISTA DE ABREVIATURAS

(por sus siglas en inglés y en orden alfabético)

APC: célula presentadora de antígeno profesional
CTB: subunidad B no tóxica de la toxina del cólera
DC: célula dendrítica
ICP: inhibidores de puntos de control inmunitario
i.d.: intradérmico
i.p.: intraperitoneal
i.v.: intravenoso
MAA: antígeno asociado a melanoma
mAb: anticuerpo monoclonal
MO4: línea celular B16-F10-OVA
OT-I: linfocitos T CD8⁺ OVA-específico
OT-II: linfocito T CD4⁺ OVA-específico
OVA: ovoalbúmina
PAMP: patrón molecular asociado a patógeno
Porinas: proteína de membrana externa
STING: estimulador de genes de interferón
S. Typhi: *Salmonella enterica* serovar Typhi
s.c.: subcutáneo
SDLN: nódulo linfático drenante de piel
Tcm: linfocito T de memoria central
Tem: linfocito T de memoria efectora
TIL: linfocitos infiltrantes de tumor
Trm: memoria T residente de tejido.

RESUMEN

La inmunoterapia ha mejorado la respuesta clínica en pacientes de melanoma, sin embargo, existen pacientes que no responden a las distintas estrategias de inmunoterapia. La búsqueda de poblaciones de la respuesta inmune celular que provean el mejor control tumoral y que puedan responder a estrategias de inmunoterapia es un tema crucial en la oncoinmunología. Los linfocitos T TCF-1⁺ PD-1⁺ infiltrantes de tumor o “progenitores exhaustos” han mostrado ser una población importante para una prognosis favorable en pacientes de melanoma. Esta población responde eficientemente al bloqueo de PD-1, diferenciándose a linfocitos T TIM-3⁺ PD-1⁺ o “terminalmente exhaustos”, conocidos por tener una potente función efectora. En este trabajo se evaluó a las Porinas de *Salmonella Typhi* como un adyuvante para antígenos tumorales naturales o modelos, en estrategias terapéuticas y profilácticas de inmunización en un modelo de melanoma murino. Las Porinas como adyuvante inducen protección contra el melanoma que expresa antígenos naturales o experimentales, aún después de un segundo reto en ratones que no desarrollaron tumor después de la primera inmunización. Las Porinas expanden eficientemente linfocitos T CD8⁺ productoras de IFN- γ e inducen una memoria central y efectora en nódulos linfáticos, y de manera importante, linfocitos T de memoria residente de tejido (Trm) en la piel. Las Porinas inducen linfocitos T TCF-1⁺ PD-1⁺ CD8⁺ Trm en el estroma tumoral y la presencia de esta población correlaciona con la protección del crecimiento tumoral. Notablemente, la inmunización con Porinas coopera con la inmunoterapia anti-PD-1 retrasando el crecimiento tumoral. Estos hallazgos soportan la utilización de estrategias de inmunización para remodelar el estroma tumoral con linfocitos Trm funcionales y duraderos destacando el uso

de las Porinas como adyuvante. Además, los resultados revelan que los linfocitos CD8⁺ Trm con un fenotipo progenitor exhausto es una población importante en el control del melanoma, independientemente o en cooperación de la inmunoterapia anti-PD-1.

ABSTRACT

Immunotherapy has improved the clinical response in melanoma patients, although a relevant percentage of patients still cannot be salvaged. The search for the immune populations that provide the best tumor control and that can be coaxed by immunotherapy strategies is a hot topic in cancer research nowadays. Tumor-infiltrating TCF-1⁺ PD-1⁺ progenitor exhausted CD8⁺ T cells seem to grant the best melanoma prognosis and also efficiently respond to anti-PD-1 immunotherapy, giving rise to a TIM-3⁺ PD-1⁺ terminally exhausted population with heightened effector activity. We tested Porins from *Salmonella Typhi* as a pathogen associated molecular pattern adjuvant of natural or model antigen in prophylactic and therapeutic immunization approach against murine melanoma. Porins induced protection against melanomas carrying experimental and tumor-native antigens, even upon re-challenging of tumor-free mice. Porins efficiently expanded IFN- γ -producing CD8⁺ T cells and induced central and effector memory in lymph nodes and tissue-resident (Trm) T cells in skin. Porins induced TCF-1⁺ PD-1⁺ CD8⁺ Trm cells in the tumor stroma and the presence of this population correlated with melanoma growth protection in mice. Notably, Porins immunization also cooperated with anti-PD-1 immunotherapy to hamper melanoma growth. Our data support the use of cancer vaccination to sculpt the tumor stroma with efficient and lasting Trm cells with effector activities, highlighting the use of Porins as an adjuvant.

Furthermore, our data place CD8⁺ Trm cells with a progenitor exhausted phenotype as an important population for melanoma control, either independently or in cooperation with anti-PD-1 immunotherapy.

MARCO TEÓRICO

1. Melanoma es un cáncer agresivo e inmunogénico

El cáncer de melanoma es el tumor maligno derivado de los melanocitos, células productoras del pigmento melanina en la piel (1). Aunque el melanoma solamente representa el 1% de todos los tipos de cáncer de piel, es la causa de la vasta mayoría de las muertes relacionadas a cáncer de piel, por lo cual se considera el tipo de cáncer de piel más agresivo (2). En datos reportados en bases de datos de Estados Unidos, un melanoma localizado tiene una supervivencia del 99% a 5 años, pero cuando es invasivo el pronóstico disminuye a 24.8% (2,3). El pronóstico para pacientes diagnosticados con melanoma invasivo ha mejorado a lo largo de los últimos años, ahora más de la mitad sobreviven al menos un año gracias a los avances en nuevos tratamientos (2). En México el pronóstico para pacientes con melanoma invasivo es menos alentador. El reporte más reciente del la Clínica de Melanoma del Instituto Nacional de Cancerología menciona que la incidencia incrementó un 500% en los últimos años (4), lo cual coincide con lo que se observa en la base de datos del Global Cancer Observatory, esfuerzo de la Organización Mundial de la Salud (5). En cuanto a la morbilidad de acuerdo al estadio no existen reportes en México sobre el melanoma invasivo, a pesar de la alta morbilidad y la afectación de grupos en edad productiva (4,6).

Prácticamente todos los tipos de cáncer, al tener alteraciones genéticas, presentan antígenos diferentes a los de las células no transformadas, denominados neo-antígenos. Estos neo-antígenos son presentados en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), lo cual puede potencialmente inducir una respuesta inmune adaptativa (7). El melanoma no es la excepción ya que es considerado el tumor más inmunogénico, esto concuerda con que sea el tumor con mayor tasa de mutación y con una alta expresión de neo-antígenos (8). Correlacionando con esto, el estroma tumoral del melanoma está enriquecido de células inmunes con actividad citolítica (9). A pesar de la expresión de neo-antígenos y de su potencial de generar una respuesta inmune, ésta no es eficiente si se considera la alta mortalidad observada en los pacientes. Es por esta razón que en los últimos años el sistema inmune ha sido blanco de estrategias de terapias contra el melanoma, teniendo como objetivo promover una respuesta inmune anti-tumoral eficiente en los pacientes. Estas estrategias han sido llamadas inmunoterapias, donde la estrategia más investigada es la de los inhibidores de puntos de control inmunitario (ICP), siendo el bloqueo de las moléculas inhibitoras CTLA-4 y PD-1 las primeras aprobadas por la FDA y los investigadores James P. Allison y Tasuku Honjo, quienes descubrieron el mecanismo de acción de estas moléculas, galardonados con el Premio Nobel de Medicina el año 2018.

1.1. La quimioterapia y la inmunoterapia en melanoma

Antes del descubrimiento de la inmunoterapia, la estrategia más utilizada para combatir el cáncer de melanoma invasivo ha sido la quimioterapia. La dacarbazina es la única quimioterapia aprobada por el algoritmo para el tratamiento del melanoma invasivo por el consenso de la Society for Immunotherapy of Cancer, pero la temozolomida y

carboplatino/paclitaxel son usados dependiendo de la experiencia del médico tratante (10). La dacarbazina es un medicamento que tiene una función de metiltransferasa en las guaninas del DNA, impidiendo el proceso de replicación resultando en la inhibición de la división celular (11), teniendo un efecto terapéutico menor cuando se comparan con las dos inmunoterapias de ICP, anti-CTLA-4 y anti-PD-1, al observarse una menor supervivencia y menor tasa de respuesta (12,13).

Entre las dos inmunoterapias de ICP aprobadas por la FDA para tratar el melanoma invasivo, el bloqueo de PD-1 ha dado mejores resultados que el bloqueo de CTLA-4, y la combinación de las dos es la inmunoterapia con la mayor tasa de respuesta y supervivencia (14). Existen otras estrategias de inmunoterapias aprobadas por la FDA: Aldesleukin, citocina agonista del receptor IL-2; Interferon α -2b, citocina agonista del receptor IFNAR1/2; Peginterferon α -2b, citocina agonista del receptor IFNAR y el virus oncolítico del herpes simplex T-VEC, que infecta a los tumores y promueve su muerte (15). La mayoría de estas estrategias no son utilizadas tan frecuentemente como los ICP, por lo que existe un mayor número de estudios realizados con los ICP. Los descubrimientos recientes enfocados a entender porque un porcentaje importante de pacientes con melanoma no responde a la inmunoterapia anti-PD-1 o termina recayendo, están relacionados con una falta de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) Considerando además que los TILs expresan PD-1, el bloqueo del eje PD-1 y su ligando PD-L1 es un mecanismo relevante para rescatar su función efectora (16,17).

1.2. La inmunización como estrategia de inmunoterapia en melanoma

Dentro de las estrategias de inmunoterapia que existen para inducir una respuesta anti-tumoral que se traduzca en el control de crecimiento tumoral se encuentra la inmunización, mejor conocida como “*cancer vaccine*” en oncoimmunología. Para desarrollar una inmunización se requiere una fuente de antígeno de interés y un adyuvante para activar el sistema inmune innato. Para la fuente de antígeno existen neo-antígenos como los antígenos asociados a melanoma (MAA), siendo TRP-2, gp-100 y MART-1 los más estudiados (18), también se ha utilizado DNA circular que contenga la información genética de los antígenos de interés o un lisado tumoral, la cual contendría una mayor diversidad de antígenos (19). El antígeno es importante ya que será presentado por las células presentadoras de antígeno profesionales (APC), y así seleccionar linfocitos T que tengan un receptor de linfocitos T (TCR) que sea específico al antígeno de interés, pero para que exista una expansión clonal que se traduzca en la inducción de una respuesta inmune eficiente es crucial activar a las APC.

Las APC como macrófagos, linfocitos B y principalmente las células dendríticas (DC), que presentan los antígenos mediante MHC-I y MHC-II a linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺, respectivamente, necesitan ser activadas, lo cual resulta en la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86 que activan vía CD28 a los linfocitos T (20). Las moléculas capaces de activar a las DCs en una inmunización son los adyuvantes. Dentro de los más estudiados se encuentran los agonistas de los receptores tipo-Toll (TLR), los cuales censan patrones moleculares asociados a patógeno (PAMP) (21-25). Existen varios estudios de inmunización en modelos de cáncer murino con diferentes adyuvantes: poly I:C y ARNAX, agonistas de TLR3; CpG, agonista de TLR9; imiquimod, agonista de TLR7;

flagelina, agonista de TLR5 y lipopolisacárido, agonista de TLR4 (26-29). El objetivo de las estrategias de inmunización utilizando la mezcla de antígenos y adyuvante es inducir una respuesta de linfocitos T, de preferencia CD8 por su capacidad citotóxica que sean capaces de infiltrar el tumor para llevar a cabo su función efectora (30,31). Una gran mayoría de linfocitos T en el microambiente tumoral expresa PD-1, por lo que algunas de las estrategias de inmunización se han combinado con la inmunoterapia anti-PD-1 observándose en algunos casos una sinergia, aunque el mecanismo de acción del bloqueo de PD-1 en los TILs no se ha dilucidado por completo (26-28,32).

Hoy en día la mayoría de las estrategias aprobadas de inmunización para tratar cáncer son preventivas, ya que son para evitar los tipos de cáncer inducidos por virus, y solamente hay dos terapéuticas. Una de estas es la utilización de Bacillus Calmette-Guérin como terapia de adyuvante para el cáncer de vejiga. A pesar de que el mecanismo de acción no está completamente dilucidado, se ha propuesto que posiblemente las células tumorales de la vejiga internalizan a la bacteria, lo cual resulta en el reclutamiento de mediadores de la respuesta inmune, principalmente de linfocitos T CD8⁺, CD4⁺ y DCs (33). La otra inmunización aprobada se denomina Sipuleucel-T, la cual consiste en la inyección de DCs previamente cultivadas con el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos fusionada con el antígeno de próstata fosfatasa del ácido prostático, para el tratamiento de cáncer de próstata (34). Aunque en melanoma aún no existe ninguna inmunización terapéutica aprobada por la FDA, existen varios ensayos clínicos utilizando estrategias muy variadas (35). También existen intentos en Canadá y en Chile para utilizar la inmunización como una alternativa para tratar el melanoma. La estrategia de inmunización en Canadá se basa en lisados de melanoma, mientras que en Chile en DCs de pacientes cultivadas con

lisados de melanoma (36-39). Los esfuerzos para el desarrollo de *cancer vaccines* son extensos, con propuestas para el uso de diferentes estrategias que combinan distintos antígenos y adyuvantes, así como también intentos de combinarlas con otras inmunoterapias (40).

2. *Las Porinas de Salmonella Typhi como potencial adyuvante en un modelo tumoral*

Nuestro grupo de investigación ha estudiado la capacidad de adyuvante de las proteínas de membrana externa (Porinas) de *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*). Las Porinas son un clásico PAMP que inducen una potente respuesta inmune en ratón y en humano, manifestándose en una inducción de anticuerpos y linfocitos T, resultando en la protección contra la infección de *S. Typhi* (41,42). Se ha reportado que las Porinas son capaces de incrementar la expresión de las moléculas CD86 y CD40 en DCs mediante la activación de TLR2 y TLR4 (43). También una inmunización con las Porinas es capaz de inducir linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ Porinas-específicos y linfocitos T CD4⁺ específicos contra el antígeno modelo ovoalbúmina (OVA) cuando son utilizadas como adyuvante (41,44-46). Se ha reportado además que se induce un fenotipo de linfocitos T cooperador foliculares por las Porinas, lo cual promueve la generación de linfocitos B de memoria derivados de centros germinales, explicando la generación de anticuerpos de larga duración (45). Importantemente, las Porinas también pueden inducir la generación de linfocitos T productores de IFN- γ , IL-17 e IL-2, citocinas que tienen un papel anti-tumoral importante (46-50). A pesar de que aún no se ha evaluado la capacidad de las Porinas como adyuvante para inducir linfocitos T CD8⁺ contra antígenos modelo o derivados de tumores, las Porinas

son eficientes en activar DCs e inducir una respuesta efectora y de memoria, por lo que se propone como un adyuvante en un modelo tumoral.

3. *La subunidad B no tóxica de la toxina del cólera como adyuvante en un modelo tumoral*

Nuestro laboratorio también se ha enfocado al estudio de la capacidad como adyuvante de la subunidad B no tóxica de la toxina del cólera (CTB). La CTB es parte de la toxina del cólera que no tiene propiedades tóxicas, por lo que ha sido utilizada en humanos con buenos resultados para vacunas contra el cólera (51-53). Aunque existe evidencia que la CTB pueda activar DCs y macrófagos vía TLR (54), se le podría considerar un PAMP no clásico ya que, a diferencia de los adyuvantes mencionados, activa a las células inmunes mediante NLRP3, FcR γ -CARD9, TREM2 y LMIR5 (55,56). La CTB activa a DCs y macrófagos *in vitro*, induciendo NF κ B y varias citocinas y quimiocinas (56,57); así como también DCs *in vivo*, incrementando la expresión de CD86 e induciendo migración y acumulación en placas de Peyer (58-61).

También se ha evaluado la respuesta adaptativa inducida por la CTB, donde se ha reportado que su inmunización intradérmica en conjunto con antígenos modelo promueve una respuesta de linfocitos T CD4⁺ productoras de IFN- γ e IL-17 (61). El efecto adyuvante de la CTB ha sido evaluada en varios modelos, mostrando eficiencia contra el virus de la influenza (62), rotavirus (63), *Bordetella pertussis* (64), *Streptococcus pneumoniae* (65) y *Francisella tularensis* (66). La mayoría de estos estudios se les ha relacionado con la inducción de una respuesta de linfocitos T CD4⁺ y/o la producción de IFN- γ , correlación que

también se observó con el modelo de melanoma murino (63). A pesar de que se ha observado que la CTB puede ser un adyuvante en un modelo tumoral (63), falta determinar que poblaciones de linfocitos T CD8⁺ se induce en el estroma tumoral.

4. La participación de linfocitos T en la respuesta antitumoral en melanoma

La teoría más aceptada al respecto de la relación entre la respuesta inmune y el tumor es la inmunovigilancia, que es la capacidad del sistema inmune de reconocer y eliminar activamente células tumorales (7). Aunque cada vez aumentan los reportes que muestran un papel antitumoral de la respuesta inmune innata, la mayoría de datos clínicos y experimentales evidencian que la respuesta inmune adaptativa es la más importante en la inmunovigilancia, en particular los linfocitos T CD8⁺ y la firma de IFN- γ (67-69). Aunque los linfocitos T CD4⁺ se les ha relacionado con mal pronóstico, principalmente asociado con la presencia de la subpoblación de linfocitos con función reguladora (70-72), hay evidencia que los linfocitos T CD4⁺ son importantes para la cooperación en la respuesta efectora eficiente de los linfocitos T CD8⁺ y para la disminución de la expresión de ICPs (73,74). De las subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺ que han tenido una mayor correlación con una eficiente respuesta anti-tumoral es el fenotipo de memoria residente de tejido (T_{rm}). Por otra parte, los subtipos de linfocitos exhaustos que se caracterizan por la expresión del marcador PD-1 se pensaba que no eran funcionales, sin embargo recientemente se ha demostrado que pueden ser rescatados y ejercer su función efectora.

4.1. Diferenciación y participación de los linfocitos T de memoria residente de tejido en la respuesta inmune contra melanoma

Descubrimientos recientes han sugerido que para tumores sólidos la capacidad de los linfocitos T de llevar a cabo su función en la localización específica del estroma tumoral es determinante para el control tumoral. Es importante la presencia de linfocitos funcionales y metabólicamente activos, que se puedan adherir y migrar de forma correcta en el tejido. Los linfocitos Trm, residentes de tejido, que se observan en el tumor expresan la integrina CD103, ligando de E-cadherina, molécula que se expresa en células epiteliales, esta interacción les permite la adherencia apropiada al epitelio de distintos tejidos (75). Los linfocitos Trm expresan además CD69, que a pesar de que se utiliza como marcador de activación temprana, su función es inhibir la expresión de receptores de esfingosina-1-fosfato (76,77), un quimioatrayente producido por células endoteliales para iniciar la extravasación (78). Estos linfocitos también expresan CD44, que además de ser un marcador de memoria, se une al ácido hialurónico, componente de la matriz extracelular (75,79). Estas moléculas permiten la retención de linfocitos Trm en el tejido siendo capaces de proliferar *in situ*, pero se ha estipulado que son incapaces de regresar a circulación. Recientemente se ha demostrado que los linfocitos Trm tienen una firma transcriptómica diferente a los subtipos de linfocitos T de memoria circulante, central (Tcm) y efectora (Tem) (80). Interesantemente, estudios recientes demostraron que los linfocitos Trm ya establecidos en piel son capaces, después de un segundo encuentro con su antígeno, de proliferar, regresar a circulación y diferenciarse en Tcm y Tem en ganglios (81,82).

El precursor de los linfocitos Trm proviene del precursor de memoria T KLRG⁻, del cual también se derivan los linfocitos Tcm y Tem (80,83,84). Los linfocitos T vírgenes y Tcm son capaces de diferenciarse a linfocitos Trm, siendo más eficientes los linfocitos T vírgenes (85,86). Se observó que a los 7 días de una infección con un modelo viral, los linfocitos Trm en desarrollo tienen el 90% del programa transcripcional, por lo que se asume que el inicio de la firma Trm ocurre de manera temprana antes de los 7 días de infección (83). Las DCs durante el *priming* son capaces de proveer diferentes señales para la diferenciación a los subtipos de memoria, observándose que las DCs CLEC9a⁺ CD8α⁺ dependientes del factor de transcripción Batf3 son necesarias para la diferenciación a linfocitos Trm, pero no para las de memoria circulante (87). Este hallazgo en ratón se observó de igual forma en humanos con las DCs CD1c⁺ y CD141⁺ (88). La capacidad de DCs CLEC9a⁺ CD8α⁺ Batf3-dependiente en la inducción de una respuesta Trm se le atribuye a la señalización accesoria en el *priming*, por la secreción de IL-12, IL-15 y expresión de CD24 (87). Un paso crítico en la generación de linfocitos Trm es el reclutamiento de linfocitos pre-Trm en los tejidos, la cual se puede promover por la expresión de ligando de CCR5 por los macrófagos (89) y la expresión local de CXCL9 y CXCL10, la cual es promovida por la citocina IFN-γ secretada por linfocitos T CD4⁺ (80,90). Una vez en el tejido, la maduración completa del fenotipo Trm dura alrededor de 2 semanas, cuando las moléculas características, CD69 y CD103, se expresan en los linfocitos T, esto en modelos de infección viral en piel (80,84,91,92). También es crucial la señalización vía TGF-β, ya que induce la expresión de CD103 el cuál es determinante para mantener el linfocito Trm en tejido (80,93-95).

Los mecanismos mencionados en conjunto son determinantes en la inducción y migración de linfocitos con fenotipo de memoria residente de tejido, los cuales tienen distintos mecanismos para combatir las células tumorales (96,97). Los linfocitos Trm son capaces de secretar granzima B (GZMB) permitiendo la destrucción directa de las células tumorales, resultando en la liberación de nuevos antígenos asociados a tumor, los cuales podría inducir una respuesta de linfocitos T con un mayor repertorio anti-tumoral (98-100). También son capaces de secretar IFN- γ , el cual inhibe la división de células tumorales y aumenta la expresión de MHC-I (101). El IFN- γ también es capaz de inhibir la resistencia del tumor a la quimioterapia mediada por fibroblastos asociados a tumor (102,103), así como reclutar nuevas células de la circulación (90,104). Los linfocitos Trm también son capaces de secretar diferentes quimiocinas, como CCL4 y XCL1, las cuales atraen DCs XCR1⁺ Batf3⁺ (105), capaces de tomar antígenos tumorales y así inducir nuevos linfocitos Trm (106,107). Todos estos mecanismos anti-tumorales podrían explicar porque la presencia de linfocitos T CD8⁺ Trm correlaciona con buen pronóstico en diferentes tumores sólidos en humanos (98,99,108-116)

Considerando lo anterior, es importante que las estrategias de *cancer vaccines* sean capaces de inducir una respuesta Trm, ya que se ha observado que son más eficientes que las inmunizaciones que solamente inducen una memoria circulante (63,85,109,117-119), siendo unos de los adyuvantes capaces de inducir una respuesta Trm la CTB, aunque solamente se ha evaluado en los linfocitos T CD4⁺ (63). Aunque la administración de estas inmunizaciones que generan una respuesta Trm no son sistémicas sino que por vía epidermal, se han observado linfocitos Trm específicos en piel distante al lugar de inmunización (119),

inclusive en tejido intestinal (63). Esto podría ser el resultado del reclutamiento a piel de precursores de linfocitos Trm en la fase efectora de la respuesta (80,83,120), para luego la diseminación a través de la circulación y epidermis (81,82,121), promoviendo una protección sistémica a un reto con melanoma (119). Además, los linfocitos Trm expresan el ICP PD-1 en tejido (76,122) y en tumor (98,112,113,117,123,124), por lo que su inducción en combinación con el bloqueo de PD-1 podría tener un efecto sinérgico. De hecho, los linfocitos Trm responden al anticuerpo (mAb) anti-PD-1 aumentando su capacidad citolítica *in vitro* (98) e incrementando su número de infiltrado en melanoma (85), posiblemente por su capacidad de proliferar *in situ* (85,125).

4.2. Diferenciación y participación de los linfocitos T exhaustos en la respuesta inmune contra melanoma

El otro fenotipo de linfocitos T que se ha asociado con el control del crecimiento tumoral es el fenotipo exhausto, inducido por la estimulación crónica de antígenos tumorales, el cual inicialmente fue asociado con el marcador PD-1 y una disfunción en linfocitos T (126). Sin embargo, basándose en modelos de infección viral en ratón, se está empezando a comprender que hay diferentes subtipos de linfocitos T PD-1⁺ CD8⁺ que conforman el fenotipo exhausto, como el progenitor exhausto (TCF-1⁺ PD-1⁺) y el terminalmente exhausto (TIM-3⁺ PD-1⁺) (127,128). Una de las diferencias que existen entre estos dos subtipos es que los linfocitos T progenitor exhaustos son capaces de proliferar ante la terapia anti-PD-1, resultando en un control inmune eficiente de las infecciones virales crónicas (129-131).

Recientemente los dos subtipos exhaustos han sido identificado en los TILs provenientes de melanoma en ratón (127). De forma similar a lo observado con las infecciones virales, solamente los linfocitos T progenitores exhaustos infiltrantes de tumor proliferaron ante el bloqueo de PD-1 (127). Previamente se había evaluado una población equivalente en humanos, células TCF-7⁺ CD8⁺ (el ortólogo de TCF-1 en humanos). La presencia de esta población correlaciona positivamente a la respuesta a la inmunoterapia anti-PD-1, aumentando la supervivencia de los pacientes con melanoma (132). Aunque los linfocitos T progenitores exhaustos no son capaces de tener una respuesta efectora, son capaces de diferenciarse a linfocitos T terminalmente exhaustos con una potente actividad anti-tumoral, como la citotoxicidad y secreción de moléculas como IFN- γ y GZMB (133,134).

Estos hallazgos no son únicos de melanoma, ya que estos subtipos exhaustos han sido identificados en pacientes con cáncer de riñón y pulmón, observándose un mejor pronóstico con la presencia de linfocitos T progenitor exhaustos (135,136). La mayoría de los estudios se enfocan en los fenotipos progenitor exhausto y terminalmente exhausto, pero estudios transcriptómicos de células independientes han evidenciado que pueden existir un mayor número de poblaciones, ya que en estudios de cáncer de pulmón humano se identificaron 2 subtipos (terminalmente diferenciado TIM-3⁺ y tipo-célula madre TCF-1⁺) (135) y en melanoma humano y murino 4 subtipos (dos subtipos TCF-1⁺, uno residente CD69⁺ y otro circulante CD69⁻, tipo-efector y terminalmente exhausto) (137). Estos estudios sugieren que estas subpoblaciones exhaustas podrían ser estados transicionales de la diferenciación de los linfocitos T progenitores exhaustos a las terminalmente exhaustos. Tomando en cuenta la

sensibilidad a la inmunoterapia anti-PD-1 de los linfocitos T progenitores exhaustos, se ha evaluado cuales son los factores de transcripción requeridos para su desarrollo y su papel en diferentes tipos de cáncer (138). Por otra parte, considerando que los linfocitos T terminalmente exhaustos son capaces de destruir las células tumorales, a diferencia de su precursor, ambos subtipos son cruciales para una eficiente respuesta anti-tumoral (127,128), por lo que poder inducirlos por medio de estrategias de *cancer vaccines* sería de gran relevancia para la inmunoterapia. Recientemente se reportó que por medio de una transferencia adoptiva y la inmunización con un antígeno modelo, péptido de gp33, y el adyuvante poly I:C, se puede inducir linfocitos T TCF-1⁺ en el melanoma de ratón (139). En concordancia con reportes previos, la presencia de esta población hace más eficiente la inmunoterapia anti-PD-1/CTLA-4 (139). De esta manera la búsqueda de adyuvantes que puedan inducir estas poblaciones aún en ausencia de estrategias de transferencia adoptiva podría ser de gran importancia, considerando que en humanos no todos los pacientes presentan una respuesta natural contra el tumor.

JUSTIFICACIÓN

El melanoma es el cáncer de piel más agresivo. Afortunadamente las estrategias de inmunoterapia, principalmente el bloqueo del ICP PD-1, han proporcionado una mejora importante en los pacientes de melanoma. A pesar de esto, un porcentaje importante de pacientes no responden a esta terapia. Una de las principales causas de falta de respuesta a la terapia con anticuerpos anti-PD-1 es la falta de linfocitos T en el infiltrado tumoral, por lo que las estrategias para inducir una respuesta de linfocitos infiltrantes de tumor son de gran relevancia. La estrategia de inmunoterapia que es capaz de inducir una respuesta inmune es

la inmunización terapéutica o “cancer vaccine”, la cual requiere de una fuente de antígenos tumorales, como los MAAs, y un adyuvante que pueda activar a las subpoblaciones de DCs que beneficien la inducción de una respuesta mediada por linfocitos T con un fenotipo eficiente y una función anti-tumoral eficiente.

Dentro de los adyuvantes más eficientes utilizados en diferentes estrategias de inmunización se encuentran los tipos PAMPs, que activan a DCs por medio de TLRs. Estas estrategias de inmunización terapéuticas se han utilizado contra melanoma, observándose mejores resultados cuando se utilizan en combinación con inmunoterapia anti-PD-1. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual se obtiene un efecto sinérgico, considerando los diferentes fenotipos que induce la inmunización en el tumor. Recientemente se ha reportado que los linfocitos Trm son determinantes en el control del crecimiento tumoral en melanoma. De manera importante se reportó además que los linfocitos T CD8⁺ con un fenotipo de progenitor exhausto, responden ante el bloqueo de PD-1, diferenciándose a linfocitos T terminalmente exhaustos, los cuales muestran una respuesta efectora anti-tumoral. Existen varias estrategias de inmunizaciones, con distintos adyuvantes capaces de inducir una respuesta anti-tumoral eficiente. En algunas inmunizaciones se ha observado un incremento en la respuesta cuando se combina con la inmunoterapia anti-PD-1, sin embargo, no se ha estudiado a profundidad las poblaciones que se inducen y que podrían participar en esta sinergia. Recientemente se reportó que, en una estrategia de inmunización utilizando poly I:C como adyuvante, la inducción de linfocitos T CD8⁺ con fenotipo de progenitor exhausto fue determinante en el control tumoral y en la sinergia con el bloqueo de PD-1 (139). Por lo que evaluar estrategias de inmunización que induzcan este fenotipo, así como determinar si este fenotipo progenitor exhausto podría estar asociado a la inducción de

linfocitos de memoria residente de tejido, los cuales son determinantes en el control tumoral, es de vital importancia.

En este contexto, evaluar el papel de las Porinas como un adyuvante en la protección contra el crecimiento de melanoma, así como evaluar las poblaciones que se inducen para determinar su potencial de respuesta en combinación con la terapia anti-PD-1 en un modelo experimental de melanoma, generaría conocimiento de vanguardia en el campo de la inmunoterapia en cáncer.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las Porinas utilizadas como adyuvante en un modelo de melanoma en ratón podrían inducir una respuesta anti-tumoral eficiente mediada por linfocitos T de memoria, ya sea independiente o en combinación con la inmunoterapia anti-PD-1?

HIPÓTESIS

La inmunización con las Porinas como adyuvante en un modelo de melanoma en ratón inducirá una respuesta anti-tumoral eficiente mediada por linfocitos T de memoria, resultando en una sinergia con la inmunoterapia anti-PD-1.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la inmunización con las Porinas como adyuvante en un modelo de melanoma en ratón induce una respuesta anti-tumoral eficiente mediada por linfocitos T de memoria, así como evaluar la sinergia con la inmunoterapia anti-PD-1.

OBJETIVOS

1. Determinar si una inmunización profiláctica y terapéutica con las Porinas como adyuvante es capaz de evitar o retrasar el crecimiento tumoral de melanoma.
2. Evaluar el fenotipo de memoria que induce una inmunización con las Porinas como adyuvante en el sitio de inoculación y en el ganglio drenante.
3. Determinar si la respuesta anti-tumoral inducida en el estroma tumoral por las Porinas es mediada por linfocitos T de memoria residentes de tejido, así como el fenotipo exhausto de esta población.
4. Evaluar el potencial de adyuvante de las Porinas utilizando distintos antígenos de melanoma.
5. Comparar la respuesta inmune inducida por las Porinas, un adyuvante PAMP clásico, contra un adyuvante PAMP no clásico.
6. Determinar el impacto del control tumoral por la combinación de la inmunización utilizando las Porinas como adyuvante y la inmunoterapia anti-PD-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones

Los ratones con fenotipo silvestre C57BL/6 fueron obtenidos del Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM y BIOINVERT. Los ratones transgénicos OT-IxCD45.1⁺ fueron obtenidos del Laboratorio Crispín-Rosetti, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, y los OT-IIxCD45.1⁺ del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con las normas sobre cuidado y experimentación en animales establecidas por las regulaciones nacionales y el Comité Institucional de Ética (R-2015-785-008). Los ratones utilizados tuvieron la misma edad (8-10 semanas) y sexo (machos).

Reto de melanoma

Las líneas celulares de melanoma B16-F10 o B16-F10-OVA (MO4) fueron cultivadas con DMEM suplementadas con 10% de suero fetal bovino (FBS), 0.1% penicilina/estreptomicina, 0.2% l-glutamina (Gibco), 0.05% 2-mercaptoetanol, 0.01% piruvato de sodio, 0.1% HEPES, y 0.1% aminoácidos no-esenciales. Las líneas de melanoma fueron inyectadas por vía subcutánea (s.c.) 2.5×10^5 células en el dorso izquierdo. El ancho y largo de los tumores fue medido con un Vernier cada dos días después del día 5 de la inoculación. El volumen tumoral fue calculado en mm³ con la siguiente fórmula: $4/3\pi (\frac{1}{2} \text{ ancho})^2 (\frac{1}{2} \text{ largo})$. También se anotó el día de aparición del tumor mediante palpación manual,

para así calcular el porcentaje de ratones libres de tumor. Ratones con un tumor mayor a 7000 mm³ o con caquexia fueron sacrificados.

Inmunización e inmunoterapia

Los ratones fueron inyectados por vía s.c. en el dorso izquierdo con 30 µg del antígeno modelo ovoalbúmina (OVA) y 10 µg del adyuvante: las Porinas Omp-C y Omp-F de *S. Typhi* 9,12, Vi:d. ATCC 9993 obtenido del laboratorio del Dr. Constantino López, UIMIQ (42) o la subunidad B no tóxica de la toxina del cólera (CTB) (Sigma-Aldrich). Inyecciones s.c. con PBS, OVA, Porinas o CTB fueron utilizadas como grupos control. Para el experimento con los antígenos asociados melanoma (MAA), los ratones fueron inyectados con 70 nmol de TRP-2 (AnaSpec) y 70 nmol de gp100 (MyBioSource), en presencia o no de Porinas, 10 y 3 días antes del reto con B16-F10, basado en trabajos previos (140).

Para los experimentos profilácticos, los ratones fueron retados con MO4 7 días después de la inmunización, y al día 28 los ratones inmunizados libres de tumor fueron retados por segunda vez con MO4. Para los experimentos terapéuticos el reto con MO4 fue 7 días previos de la inmunización, con o sin la inyección intraperitoneal (i.p.) de 100 µg del anticuerpo monoclonal (mAb) anti-PD-1 (BioLegend), a los días 19, 21 y 23 después del reto con melanoma, solamente en los grupos inmunizados.

Eliminación de linfocitos circulantes

Los ratones inmunizados con OVA + Porinas fueron inoculados por vía intraperitoneal (i.p.) con 100 µg del mAb anti-CD8 (TIB105), para eliminar linfocitos T CD8⁺, o 250 µg de anti-CD4 (GK1.5), para eliminar linfocitos T CD4⁺, o 250 µg del mAb control (III-10). El esquema de eliminación fue inyectando i.p. un día previo al reto con MO4, el día del reto y cada 3 días después, las últimas dos inyecciones se realizaron cada 4 días, siendo el día de término especificado en cada experimento. La inmunización fue 7 días, 4 semanas o 4 semanas con un refuerzo antes del reto con MO4. Al término del experimento se obtuvieron muestras tumorales y de sangre, para identificar linfocitos Trm y circulantes, respectivamente. Los linfocitos infiltrantes de tumor fueron obtenidos del tumor y teñidos para CD45, FixAqua, CD8, CD4, CD103, CD69; las células mononucleares de sangre periférica, fueron teñidos para CD8 y CD4 para ser analizados por citometría de flujo.

Enriquecimiento de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ OVA-específicos y transferencia celular

Se colectaron los ganglios linfáticos drenantes de piel (SDLN), ganglios mesentéricos y bazo de los ratones OT-IxCD45.1⁺ y OT-IIxCD45.1⁺, para ser colocados de forma separada en medio RPMI (Gibco) suplementado al 5% con FBS, 300µg/mL de glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina (Biowest), para ser macerados y obtener una suspensión celular. Los eritrocitos fueron lisados con el buffer de lisis RBC (BioLegend). Las suspensiones de los ganglios y el bazo fueron mezcladas e incubadas por 30 min en hielo con los sobrenadantes de hibridoma de rata caseros contra CD4 (GK1.5), linfocitos B (RA3.6B2), células MHC-II⁺ (NIMR4), macrófagos (F4/80) y células NK (NK1.1) para

obtener linfocitos T OT-IxCD45.1⁺; y contra CD8 (TIB105), linfocitos B (RA3.6B2), células MHC-II⁺ (NIMR4), macrófagos (F4/80) y células NK (NK1.1) para obtener linfocitos T OT-IIxCD45.1⁺. Luego las células fueron lavadas y resuspendidas en medio RPMI suplementado y colocados en cajas Petri, previamente recubiertas con anti-IgG de rata (ThermoFisher), e incubadas por 40 min a 4 °C. Las células no adherentes fueron recuperadas, lavadas y resuspendidas en PBS para su inyección intravenosa (i.v.) por la vena retro-orbital, con una pureza de OT-I y OT-II mayor al 95%.

Los ratones CD45.2⁺ congénitos recibieron i.v. 3×10^6 linfocitos T OT-IxCD45.1⁺ y 3×10^6 linfocitos OT-IIxCD45.1⁺. Después de 24 horas los ratones fueron anestesiados para ser inmunizados intradérmicamente (i.d.) en ambas orejas con 15 µg del antígeno OVA y con 5 µg de Porinas o 5 µg de CTB como adyuvante.

Procesamiento de Oreja y Tumor

Después de 7 o 28 días de la inmunización, los ratones previamente transferidos con linfocitos T OT-I y OT-II, fueron sacrificados para colectar SDLN y las orejas. Los SDLN fueron macerados y pasadas por un filtro de 70µm (Corning). La suspensión celular de la piel fue obtenida mediante una digestión enzimática con 0.25 mg/mL de Liberasa TL (Roche) y 0.125 mg/mL de DNAsa (Roche) por 45 min a 37° C, para luego ser cortada en pequeños trozos con tijeras e incubada en la misma condición y agitación constante. La digestión enzimática fue detenida agregando 0.5 µM EDTA, para luego ser filtrada con un filtro de 70µm (Corning), seguido por la adición de 0.125 mg/mL de DNAsa por 5 min en hielo.

Finalmente, las células fueron lavadas con PBS, contadas y teñidas. Las células de SDLN fueron divididas para la estimulación *in vitro*. Se realizó una tinción de superficie para CD45.1, CD8, CD4, CD62L y CD44. Los linfocitos infiltrantes de piel fueron teñidos para CD45, FixAqua, CD45.1, CD8, CD4, CD103, CD69 y PD-1.

Al término de los experimentos de crecimiento tumoral, se obtuvieron muestras de tumor para analizar los TILs por citometría de flujo y cortes tumorales por inmunofluorescencia (IF) y microscopía confocal. Para obtener TILs los tumores fueron separados de la piel utilizando tijeras, y luego pesados para calcular la frecuencia de las distintas poblaciones en relación con la masa tumoral. Los tumores fueron cortados en pequeños pedazos con tijeras e incubados durante una hora con 400 U/mL de Colagenasa D (Roche) y 5 µg/mL de DNAsa en una solución salina balanceada de Hanks' con Calcio y Magnesio (Gibco). La reacción enzimática fue detenida con 0.5 µM EDTA, la suspensión celular se pasó por un filtro de 70µm, seguido de 0.125 mg/mL de DNAsa por 5 min en hielo. Las células fueron resuspendidas en una solución de Percoll al 40% y se les agregó una solución de Percoll al 90% al fondo del tubo (GE Healthcare), el cual se centrifugó por 30 min. Los linfocitos fueron colectados de la interfase, lavados y contados, para luego ser teñidos con CD45, FixAqua, CD8, CD4, CD103, CD69, TCF-1, TIM-3 y PD-1.

Re-estimulación in vitro

Las células de los SDLN fueron resuspendidas en RPMI suplementado al 10% de FBS, 300 µg/mL de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomicina, 110 µg/mL de piruvato de sodio y 10 µM β- de mercaptoetanol. Las células fueron incubadas por 48 horas con 1 mg/mL de los péptidos 257-264 (SIINFEKL) (InvivoGen) y 323–339 (InvivoGen) de OVA, seguido por la incubación con el cóctel de estimulación con inhibidor de transporte de proteínas, como lo especifica el fabricante (eBioscience), por 4 horas a 37 °C. Las células re-estimuladas fueron teñidas para CD45, FixAqua, CD45.1, CD8, CD4 e IFN-γ.

Citometría de Flujo

Para el cálculo de números absolutos, las células fueron teñidas con anti-CD45-PECy7 (BioLegend) y DAPI (ThermoFisher), mezcladas inmediatamente con las perlas de conteo absoluto CountBright (ThermoFisher) y analizadas por citometría de flujo. Para la tinción de superficie las células se tiñeron con los siguientes anticuerpos: anti-CD45-PB (BioLegend) o -PECy7, anti-CD45.1-Percp-Cy5.5 (BioLegend), anti-CD8-FITC (BioLegend) o -APC (BD Pharmingen), anti-CD4-APC-Cy7 (BD Pharmingen), anti-CD44-BV510 (BioLegend), anti-CD62L-PE-Cy7 (BioLegend), anti-CD103-PECy7 (BioLegend), anti-CD69-PE (InvitroGen), anti-PD-1-APC (BioLegend) y anti-TIM-3-PE/Dazzle™594 (BioLegend). También se incluyó el marcador de viabilidad LIVE/DEAD Fixable Aqua (Thermofisher). La tinción intracelular se realizó posterior a la tinción de superficie, incubando con soluciones de fijación y permeabilización (Thermofisher), de acuerdo con las instrucciones

del fabricante. Las tinciones intracelulares incluyeron anti-IFN- γ -APC (BioLegend) y anti-TCF-1-AF488 (Cell Signaling Technology). Las células fueron adquiridas en un citómetro BD FACSCanto II o BD FACSAria (Becton, Dickinson and company). Los datos obtenidos fueron analizados con el programa Flowjo (Tree Star, Inc.).

Inmunofluorescencia

El tejido tumoral fue embebido en Tissue-Tek (Sakura). La muestra fue cortada en secciones de 5 μ m en laminillas cargadas (Superfrost Plus Yellow) y rehidratados. Para la recuperación de antígenos inducidos por calor, se utilizó el buffer de citratos a un pH 6.0 (citrato de sodio 10 μ M) a 90 °C por 20 minutos. Las secciones fueron permeabilizadas (10 mg/mL de albumina de suero bovino, 5% de suero de caballo, 0.02% de azida de sodio y 0.5% de Tritón) por 2 horas e incubadas con los anticuerpos primarios anti-CD8-FITC, anti-CD103 (BioLegend), anti-PD-1-APC, anti-TCF-1-AF488, anti-TIM-3-PE/DazzleTM594, anti-IFN- γ -PE o anti-GZMB (BioLegend) a temperatura ambiente por 18 horas. Los mAb anti-CD103, anti-GZMB y anti-TCF-1 fueron revelados con el mAb secundario acoplado con AF-647 o AF-594 (Jackson ImmunoResearch Labs). Los núcleos fueron contrateñidos con Hoechst (Invitrogen) por 10 minutos. Las secciones fueron montadas con Vectashield (Vector Laboratories) y evaluadas en un microscopio confocal invertido Nikon Ti Eclipse (Nikon Corporation), utilizándose NIS Elements v.4.50 y analizados en el programa ImageJ (ImageJ software, National Institutes of Health; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Cuando se compararon dos grupos, la significancia estadística fue calculada usando la prueba de t-Student no pareada. Para la comparación de más de dos grupos, se utilizó la prueba de ANOVA de una o dos vías con comparación múltiple de Turkey para la significancia estadística. Para la significancia estadística para el porcentaje de ratones libres de tumor se utilizó la prueba de Log-rank (Mantel-Cox). Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

RESULTADOS

1. *La inmunización con las Porinas induce un control profiláctico y terapéutico contra melanoma*

En nuestro equipo de trabajo se reportó que una de las características de las Porinas de *S. Typhi* es la capacidad de activar DC y de inducir una respuesta mediada por linfocitos T. En este trabajo se evaluó el potencial de las Porinas como un adyuvante tipo PAMP en un modelo de melanoma en ratón, inicialmente en una estrategia de inmunización profiláctica. Con este fin, los ratones fueron inmunizados s.c. en el dorso izquierdo con el antígeno modelo ovoalbúmina (OVA) y las Porinas como adyuvante. Las mismas condiciones fueron llevadas a cabo en los grupos control: OVA, Porinas y PBS. Después de 7 días de la inmunización, los ratones fueron retados s.c. en el mismo sitio con la línea de melanoma B16-F10 que expresa constitutivamente OVA (MO4). A los ratones se les evaluó la aparición del tumor y se realizó un seguimiento del crecimiento tumoral. Se observó que el 60% de los ratones inmunizados estaban libres de tumor y el resto con un volumen tumoral menor a 2 mm³; en cambio, todos los ratones de los grupos control tenían tumores establecidos con un volumen mayor a 1000 mm³ (**Fig. 1A**). Estos resultados indican que la inmunización profiláctica con OVA + Porinas retrasa significativamente el crecimiento tumoral comparado con los grupos control.

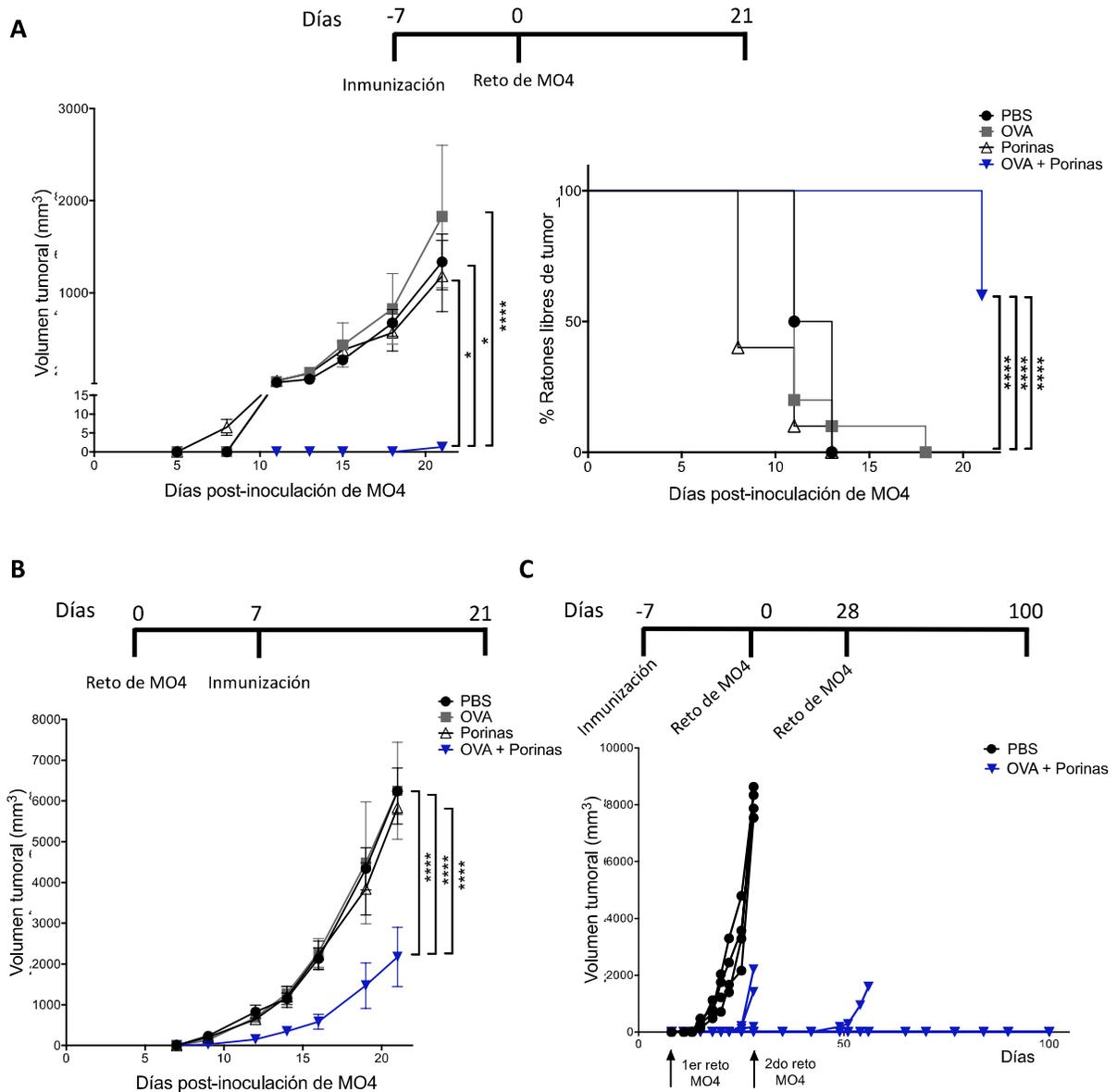


Figura 1. Las Porinas como adyuvante inducen una respuesta profiláctica y terapéutica anti-tumoral efectiva. (A) Ratones C57BL/6 fueron inmunizados s.c. en el dorso izquierdo con OVA + Porinas o inoculados con los grupos control: OVA, Porinas o PBS. Siete días después, se inocularon s.c. 2.5×10^5 células de la línea celular MO4 en el mismo sitio de la inmunización. El volumen tumoral y los ratones libres de tumor fueron evaluados cada tres días, empezando del día 7 hasta el día 21. (B) Ratones fueron retados con MO4 y después de 7 días inmunizados con OVA + Porinas o inoculado con los grupos control. (C) Los ratones inmunizados con OVA + Porinas libres de tumor del experimento profiláctico ($N = 4$), fueron retados por segunda vez con MO4 al día 28. Datos agrupados de tres experimentos independientes con 3 ratones por condición. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$.

Obtener una respuesta inmune eficiente capaz de controlar el crecimiento tumoral mediante una inmunización terapéutica es un mayor desafío comparado con la estrategia profiláctica. Para determinar si las Porinas también podrían ser capaces de controlar un tumor ya establecido, los ratones fueron inoculados s.c. con MO4 y 7 días después se les inmunizó s.c. con las condiciones mencionadas previamente. En efecto, la combinación OVA + Porinas fue capaz de controlar significativamente el crecimiento tumoral comparado con los grupos control (**Fig. 1B**). Posteriormente se puso a prueba la capacidad de las Porinas en inducir una respuesta de memoria, capaz de controlar un segundo reto de melanoma. Ya que todos los ratones tratados terapéuticamente con OVA + Porinas desarrollaron tumores pequeños, se evaluó la memoria en ratones libres de tumor después de un tratamiento profiláctico, retándolos con el melanoma MO4 28 días después del primer reto. Se observó que al final de un seguimiento de 100 días, 3 de 4 de los ratones retados por segunda vez se mantuvieron sin tumor (**Fig. 1C**). Estos resultados demuestran que las Porinas de *S. Typhi* son un eficiente adyuvante tipo PAMP en las estrategias de inmunización profiláctica y terapéutica, induciendo una protección que sugiere la inducción de una memoria eficiente contra el melanoma.

2. *Las Porinas generan una respuesta de linfocitos T de memoria circulante y residente de tejido.*

Al observar que las Porinas pueden ser utilizadas como adyuvante contra el melanoma, como siguiente objetivo se quiso comprender mejor su efecto adyuvante. Para esto se evaluó la capacidad de las Porinas de inducir linfocitos T, los cuales se han reportado como esenciales para el control tumoral. Con este fin se siguió la respuesta contra el antígeno

modelo OVA, transfiriendo i.v. linfocitos OT-IxCD45.1⁺ (CD8⁺) y OT-IIxCD45.1⁺ (CD4⁺), los cuales expresan TCRs específicos para los epítomos de OVA que son reconocidos por los linfocitos T CD8 y CD4, respectivamente.

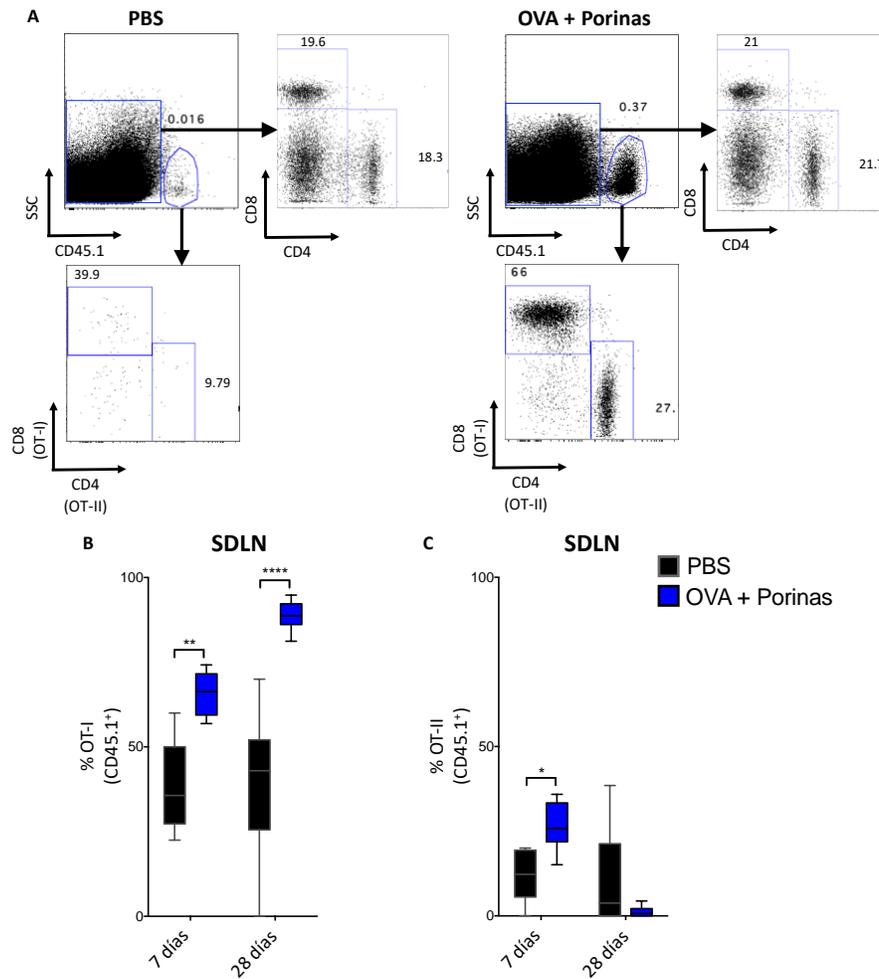


Figura 2. La inmunización con Porinas induce una expansión más eficiente de linfocitos T CD8⁺ que de linfocitos T CD4⁺. Ratones CD45.2⁺ fueron transferidos i.v. con linfocitos T CD8⁺ CD45.1⁺ (OT-I) y linfocitos T CD4⁺ CD45.1⁺ (OT-II) OVA-específicos y al día siguiente inmunizados i.d. en ambas orejas con OVA + Porinas o con los grupos control. (A) Se analizó la expansión de linfocitos T CD45.1⁺, OT-I y OT-II de SDLN mediante citometría de flujo. También se analizó los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ provenientes de la población CD45.1⁻. Comparación de la frecuencia de linfocitos OT-I (B) y linfocitos OT-II (C) SDLN entre la inmunización OVA + Porinas y PBS. Datos agrupados de tres experimentos independientes con 3 ratones por cada grupo. * p < 0.05, ** p < 0.01, **** p < 0.0001.

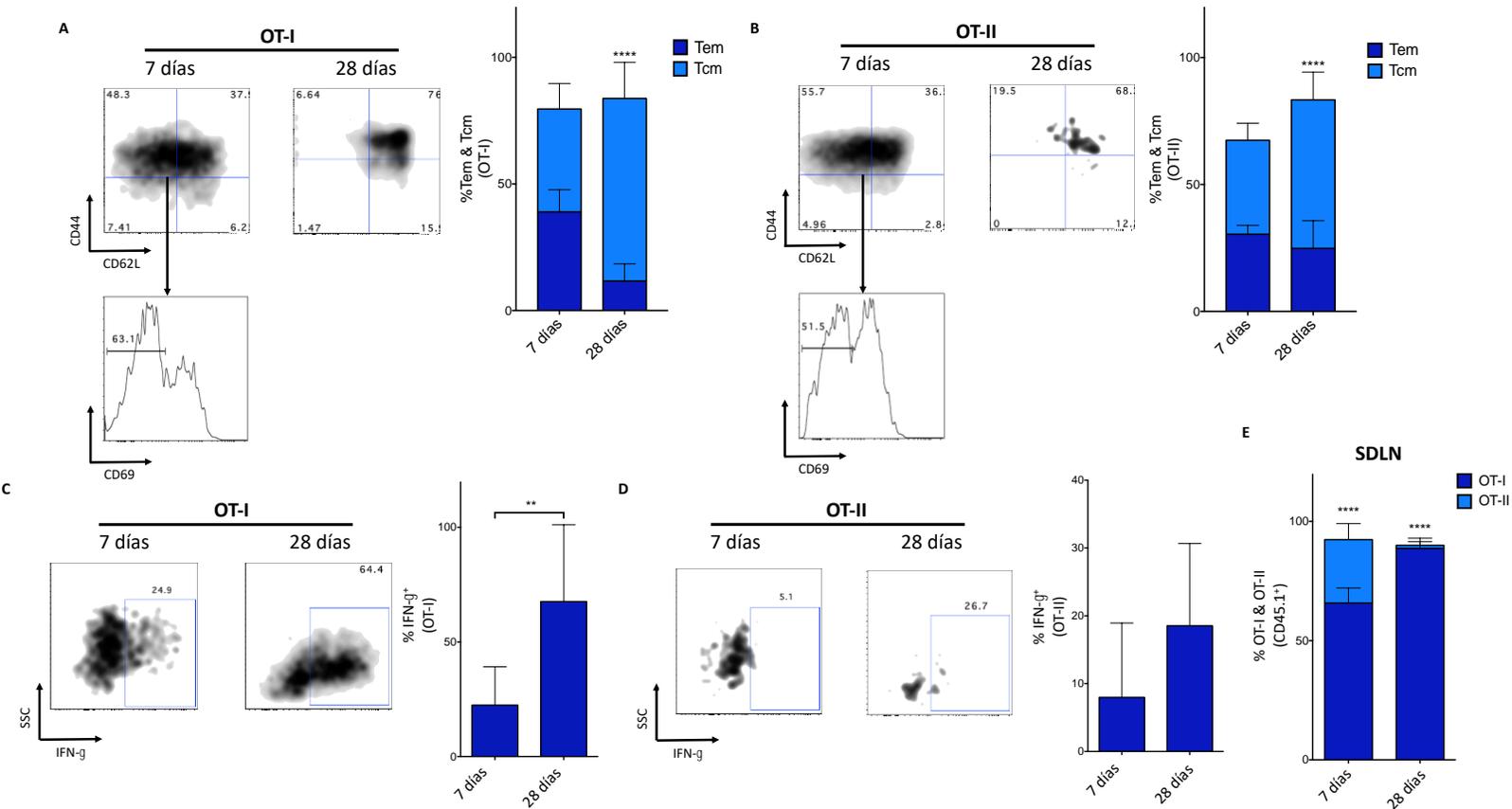


Figura 3. La inmunización con Porinas induce linfocitos T de memoria circulante y linfocitos T productores de IFN- γ . Ratones CD45.2⁺ fueron transferidos i.v. con linfocitos T CD8⁺ CD45.1⁺ (OT-I) y linfocitos T CD4⁺ CD45.1⁺ (OT-II) OVA-específicos y al día siguiente inmunizados i.d. en ambas orejas con OVA + Porinas o con los grupos control. Análisis de las Tcm (CD62L⁺ CD44⁺) y Tem (CD62L⁻ CD44⁺ CD69⁻) provenientes de linfocitos OT-I (A) y OT-II (B) SDLN a los días 7 y 28 post-inmunización. Linfocitos OT-I (C) y OT-II (D) productores de IFN- γ provenientes de SDLN re-estimulados con péptidos de OVA (SIINKFEL and 323-339). (E) Relación de la frecuencia entre linfocitos OT-I y OT-II de SDLN. Datos agrupados de tres experimentos independientes con 3 ratones por cada grupo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

La transferencia adoptiva se hizo en ratones CD45.2, los cuales fueron inmunizados i.d. con OVA + Porinas un día después en la oreja. En los ratones inmunizados con OVA + Porinas se observó al día 7 una expansión de linfocitos CD45.1⁺ en los nódulos linfáticos drenantes de piel (SDLN), las cuales consistían de linfocitos OT-I y OT-II, sin haber cambios

en la población CD45.1 negativa (**Fig. 2A**). Adicionalmente, se apreció que a los días 7 y 28 la frecuencia de los linfocitos OT-I en SDLN fue significativamente mayor en los ratones inmunizados con OVA + Porinas comparado con PBS (**Fig. 2B**), mientras que los linfocitos OT-II sólo incrementaron en porcentaje significativamente al día 7 (**Fig. 2C**). Posteriormente, se evaluaron los dos subtipos de memoria circulante, Tcm (CD44⁺ CD62L⁺) y Tem (CD44⁺ CD62L⁻ CD69⁻). Se pudo observar que en los ratones inmunizados con OVA + Porinas se aprecia una respuesta con fenotipo Tcm y con fenotipo Tem al día 7, siendo mayoritaria la población Tcm al día 28 (**Fig. 3A**). Resultados similares se observan en la formación de memoria circulante en los linfocitos OT-II inducidos por OVA + Porinas (**Fig. 3B**). Para evaluar funcionalidad, se determinó la capacidad de producir IFN- γ en linfocitos T re-estimulados *ex vivo* con péptidos de OVA-específicos para CD8 y CD4. En los ratones inmunizados con OVA + Porinas se observó al día 7 un 25% de linfocitos OT-I productoras de IFN- γ , aumentando a 60% al día 28 (**Fig. 3C**). De manera similar, se observaron linfocitos OT-II IFN- γ ⁺ (**Fig. 3D**), aunque la frecuencia de OT-II fue significativamente menor que la respuesta OT-I, particularmente al día 28 (**Fig. 3E**).

Después de demostrar la capacidad de las Porinas como adyuvante de generar y expandir linfocitos T de memoria en SDLN, también se evaluó su capacidad de inducir linfocitos Trm (CD103⁺ CD69⁺) en la piel, posiblemente el tipo de memoria más relevante en el control de melanoma. Se utilizó la misma estrategia de transferencia adoptiva explicada anteriormente, observándose que únicamente en la inmunización OVA + Porinas se apreciaron linfocitos T CD45.1⁺ en la piel, tanto al día 7 como al día 28 después de la inmunización (**Fig. 4A,B**). El fenotipo Trm se observó en linfocitos OT-I y OT-II (**Fig. 4A,C**

y Fig. 5A,B), pero nuevamente con una frecuencia significativamente reducida de los linfocitos OT-II (Fig. 5C).

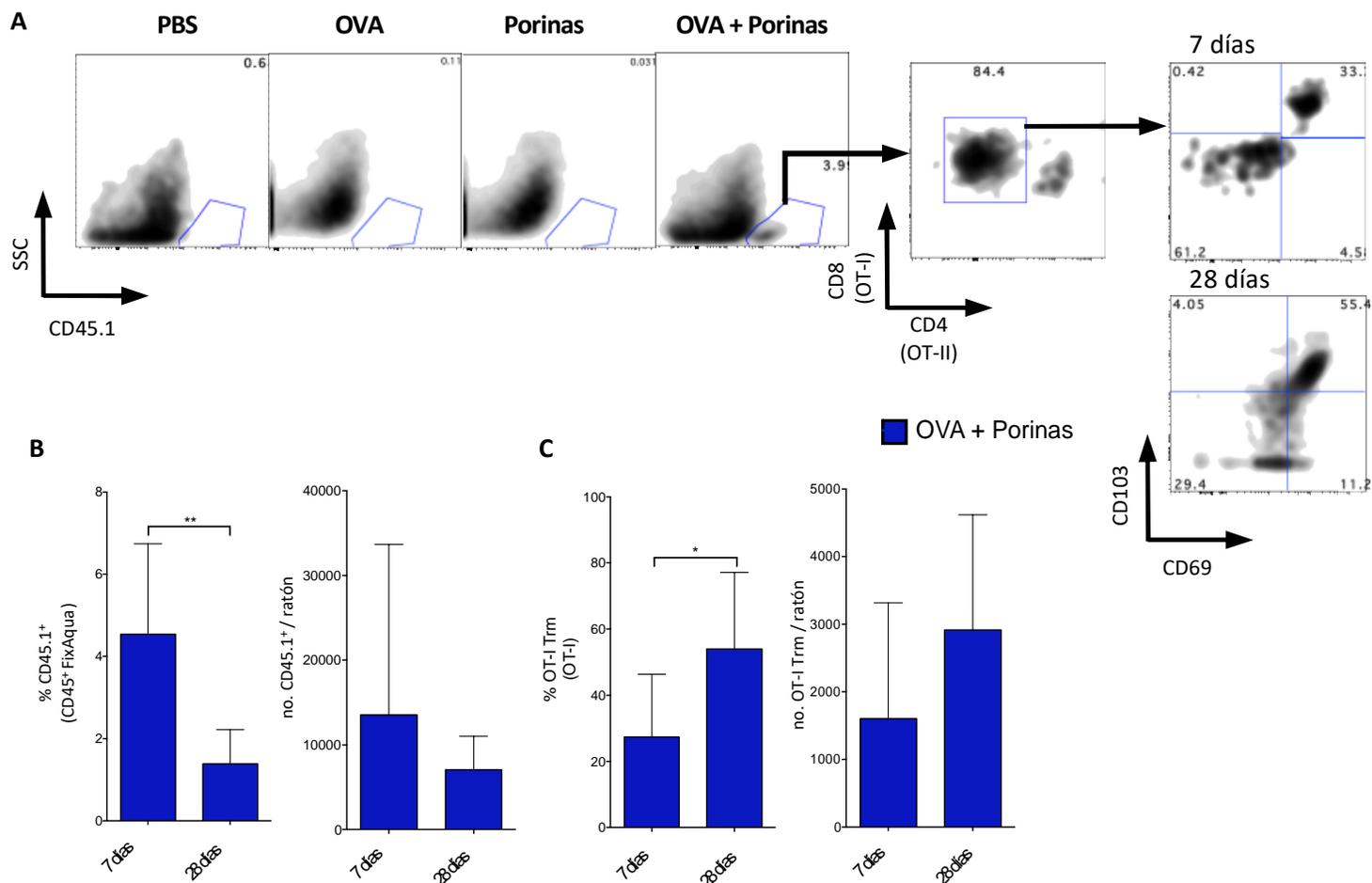


Figura 4. Las Porinas inducen eficientemente linfocitos T CD8⁺ de memoria residente de tejido. (A) Ratones CD45.2⁺ fueron transferidos i.v. con linfocitos T CD8⁺ CD45.1⁺ (OT-I) y linfocitos T CD4⁺ CD45.1⁺ (OT-II) OVA-específicos y al día siguiente inmunizados i.d. en ambas orejas con OVA + Porinas o con los grupos control, para analizar los linfocitos infiltrantes de la piel, células CD45.1⁺ y linfocitos OT-I Trm (CD103⁺ CD69⁺) a los días 7 y 28 post-inmunización. Porcentaje y números absolutos de los linfocitos CD45.1⁺ (B) y OT-I Trm (C). Datos agrupados de tres experimentos independientes con 3 ratones por cada grupo. * p < 0.05, ** p < 0.01.

Estos resultados indican que las Porinas como adyuvante inducen la formación de linfocitos productores de IFN- γ , una citocina relevante en el control del cáncer, así como también una respuesta temprana y duradera de linfocitos Tcm y Tem en SDLN, e importantemente linfocitos Trm en el sitio de inmunización, siendo la respuesta CD8 la más abundante.

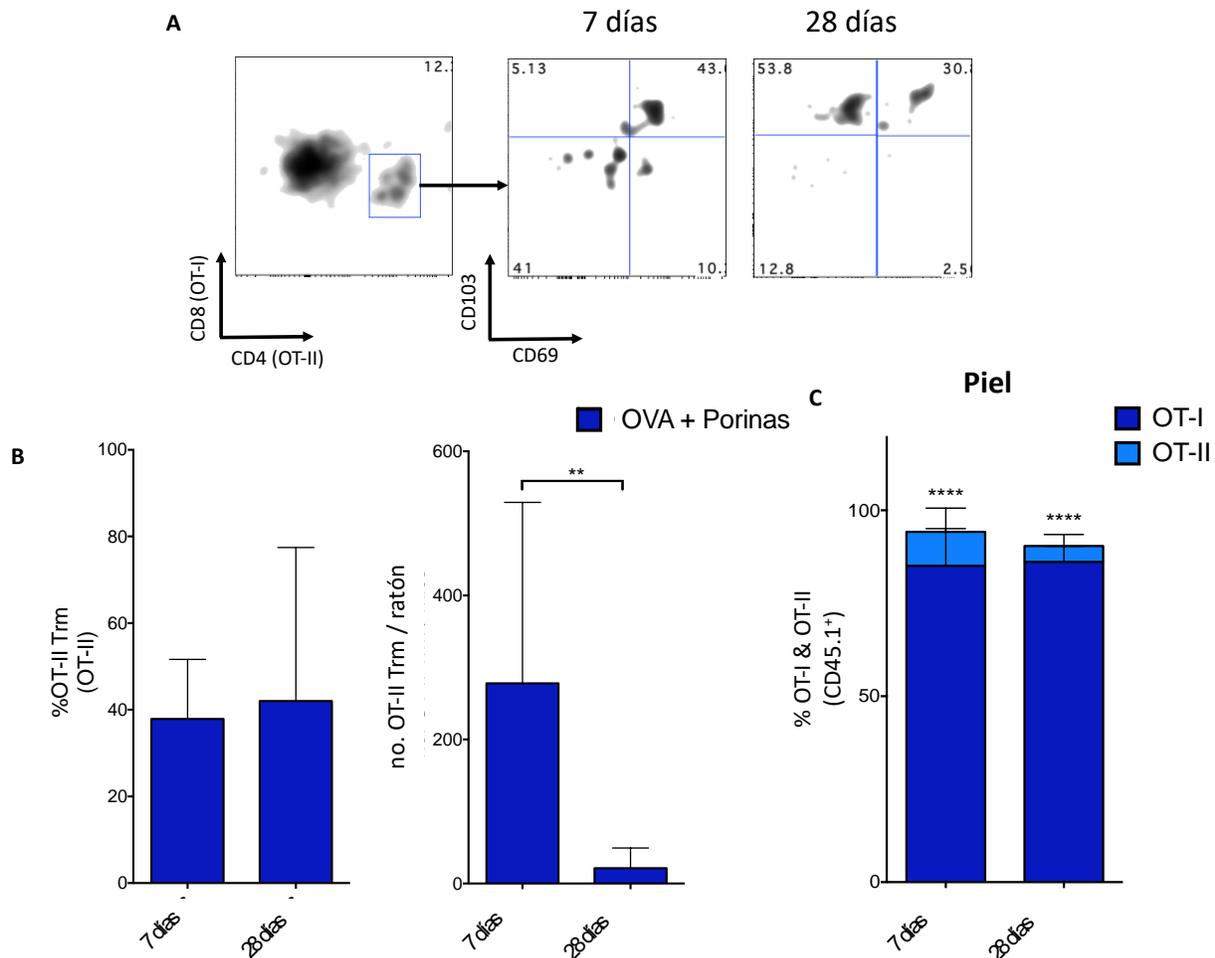


Figura 5. Las Porinas inducen linfocitos CD4⁺ Trm. (A) Ratones CD45.2⁺ fueron transferidos i.v. con linfocitos T CD8⁺ CD45.1⁺ (OT-I) y linfocitos T CD4⁺ CD45.1⁺ (OT-II) OVA-específicos y al día siguiente inmunizados i.d. en ambas orejas con OVA + Porinas o con los grupos control, para analizar OT-II Trm infiltrantes de piel a los días 7 y 28 post-inmunización. (B) Porcentaje y número de los linfocitos OT-II Trm. (C) Relación de la frecuencia entre linfocitos OT-I y OT-II infiltrantes de piel. Datos agrupados de tres experimentos independientes con 3 ratones por cada grupo. ** p < 0.01, **** p < 0.0001

3. *Las Porinas inducen linfocitos Trm funcionales que controlan el crecimiento tumoral*

Para determinar la contribución individual de linfocitos T de memoria en la protección contra el crecimiento del melanoma, se eliminaron los linfocitos T circulantes CD8⁺ y CD4⁺ inyectando i.p. 8 dosis de anticuerpos anti-CD8 o anti-CD4. Para este objetivo se compararon tres estrategias de inmunización: 1) 7 días, 2) 28 días y 3) 35 días con un refuerzo al día -28, antes del reto con el melanoma MO4. Estudios previos han documentado que los linfocitos T infiltrantes de piel y tumor son resistentes a la eliminación mediada por anticuerpos, a diferencia de los linfocitos que están en circulación (119). La eficacia de la eliminación de los linfocitos T circulantes se muestra en la **Fig. 6A**. La estrategia de inmunización y esquema de eliminación de linfocitos T se muestran en la parte superior de las **Fig. 6B-D**. Importantemente, se observó un control del crecimiento tumoral aún sin la presencia de los linfocitos T circulantes CD8⁺ o CD4⁺ con los esquemas de 7 días antes del reto y el de 35 días con refuerzo (**Fig. 6B,D**), pero no cuando se inmunizó 28 días antes del reto (**Fig. 6C**). En concordancia con trabajos previos, se corroboró que los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ infiltrantes de tumor no fueron afectados por la eliminación de linfocitos T circulantes en los ratones inmunizados con OVA + Porinas (**Fig. 6E**). Para evaluar la formación de linfocitos Trm en el estroma tumoral después de la estrategia inmunización/refuerzo, se utilizó la microscopia de inmunofluorescencia (IF) para determinar la presencia y función de la respuesta Trm. Se observó un incremento en el infiltrado de linfocitos T CD8⁺ que expresan CD103 en los ratones inmunizados comparado con el grupo control (**Fig. 7A,B**), los cuales también expresan IFN- γ (**Fig. 7A**) y GZMB (**Fig.**

7B). Similar a lo previamente reportado, la formación de la respuesta Trm no fue afectada por la eliminación de los linfocitos T circulantes (Fig. 7C).

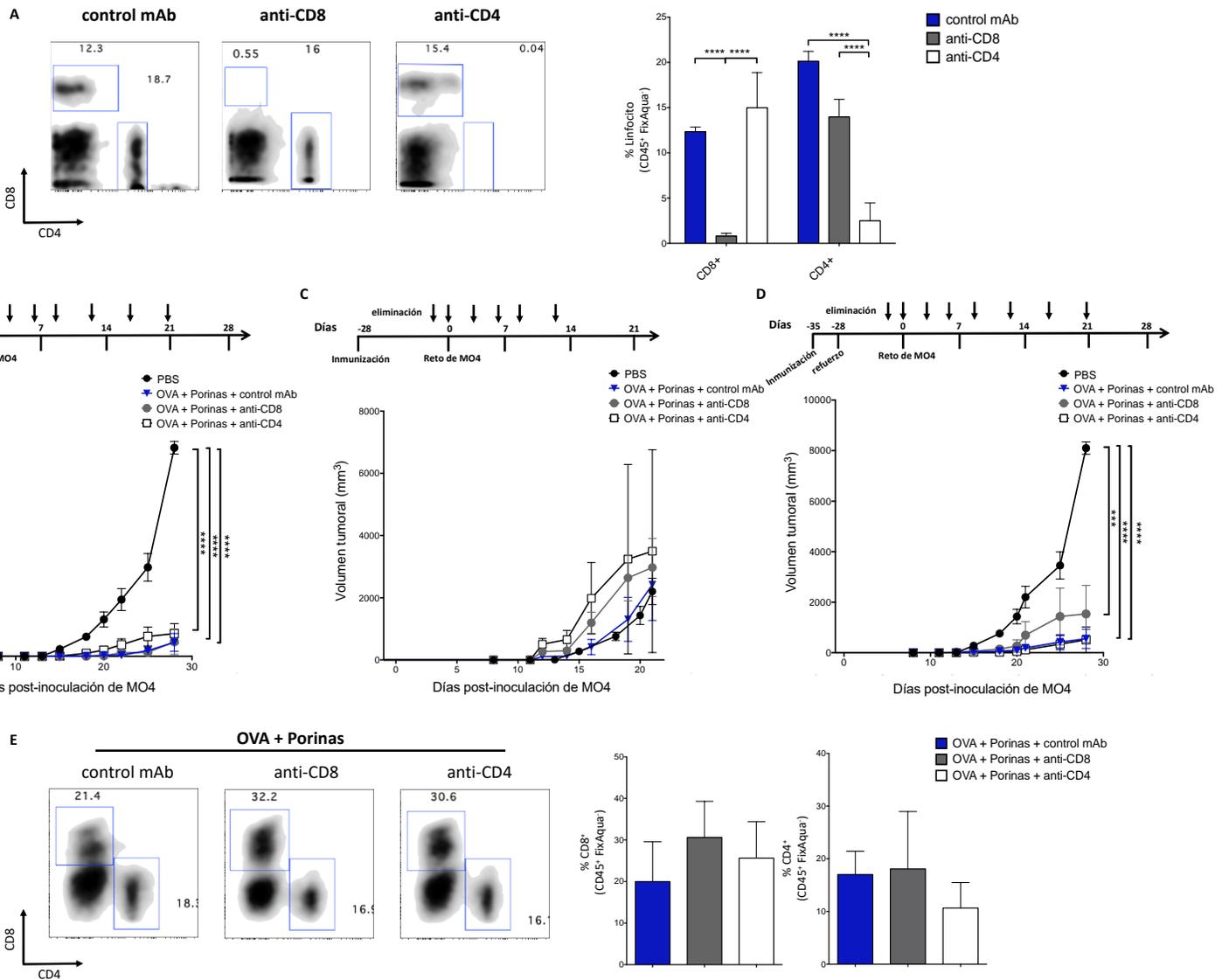


Figura 6. La inmunización con Porinas induce una respuesta Trm eficiente que correlaciona con el control tumoral. (A) Ratones inmunizados con OVA + Porinas se les eliminó los linfocitos T CD8⁺ o CD4⁺ circulantes, tratados i.p. con mAb anti-CD8 o anti-CD4, respectivamente. El seguimiento del crecimiento tumoral fue llevado a cabo con tres diferentes estrategias de inmunización, 7 días (B), 28 días (C) y 35 días con refuerzo (D) antes de la inoculación de MO4. Las flechas indican los días que se les administró los mAb anti-CD8 o anti-CD4. (E) Análisis de la frecuencia de TILs CD8⁺ y CD4⁺ mediante citometría de flujo. Datos agrupados de tres experimentos independientes con 3-4 ratones por cada grupo. *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

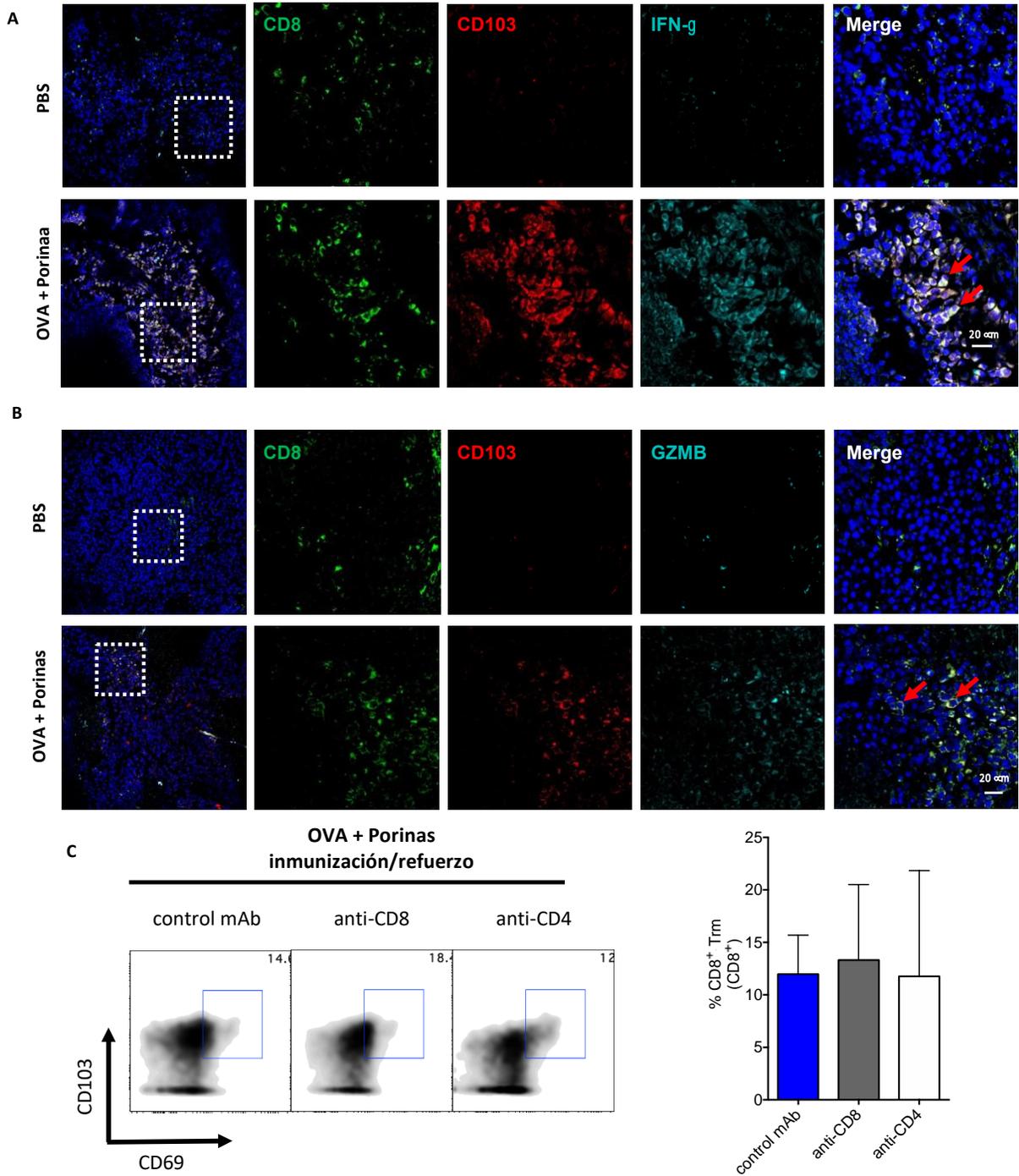


Figura 7. Las Porinas inducen linfocitos CD8⁺ Trm funcionales resistentes a la eliminación sistémica mediada por anticuerpos. Ratones fueron inmunizados 35 y 28 días antes del reto con MO4. Linfocitos del estroma tumoral CD103⁺ (rojo) CD8⁺ (verde) que expresan IFN- γ (cyan) (A) o GZMB (cyan) (B) (micrografía de inmunofluorescencia de una zona aumentada) (barra de escala = 20 μ m) (flechas rojas muestran ejemplos representativos). (C) Análisis de linfocitos Trm provenientes de TILs por citometría de flujo. Datos agrupados de tres experimentos independientes con 3-4 ratones por cada grupo.

Estos resultados indican que las Porinas modelan importantemente la respuesta de linfocitos T de la piel, lo cual parece ser determinante en el control del crecimiento tumoral, probablemente por la inducción temprana de linfocito Trm funcionales, los cuales necesitan un refuerzo para mantener la protección al reto con melanoma a tiempos tardíos.

4. *Las Porinas inducen linfocitos Trm infiltrantes de tumor que protegen contra un melanoma que expresa antígenos naturales*

Después de demostrar que las Porinas pueden inducir una respuesta antitumoral eficiente mediada por linfocitos Trm utilizando un antígeno modelo, el siguiente objetivo fue determinar la extensión de la protección contra el melanoma evaluando el efecto adyuvante de las Porinas contra dos MAAs, TRP-2 y gp100, previamente reportados como antígenos relevantes en el desarrollo de *cancer vaccines* (18). Para este objetivo los ratones fueron inmunizados 10 días antes del reto con el melanoma B16-F10, basado en estrategias de inmunización reportadas previamente (140,141). Se realizó un refuerzo 7 días después de la primera inmunización, tiempo en que los linfocitos Trm ya están establecidos en piel (**Fig. 4**). En los ratones inmunizados con MAA + Porinas se pudo observar un eficiente control del crecimiento tumoral comparado con los grupos control MAA y PBS (**Fig. 8A**). Interesantemente, las Porinas solas con el esquema de inmunización/refuerzo muestran una protección eficiente. Además, no se observa una diferencia significativa en el crecimiento tumoral entre la inmunización MAA + Porinas y las Porinas solas. Lo anterior sugiere fuertemente que las Porinas son capaces de inducir una respuesta inmune contra antígenos tumorales adicionados de forma exógena y contra antígenos tumorales endógenos.

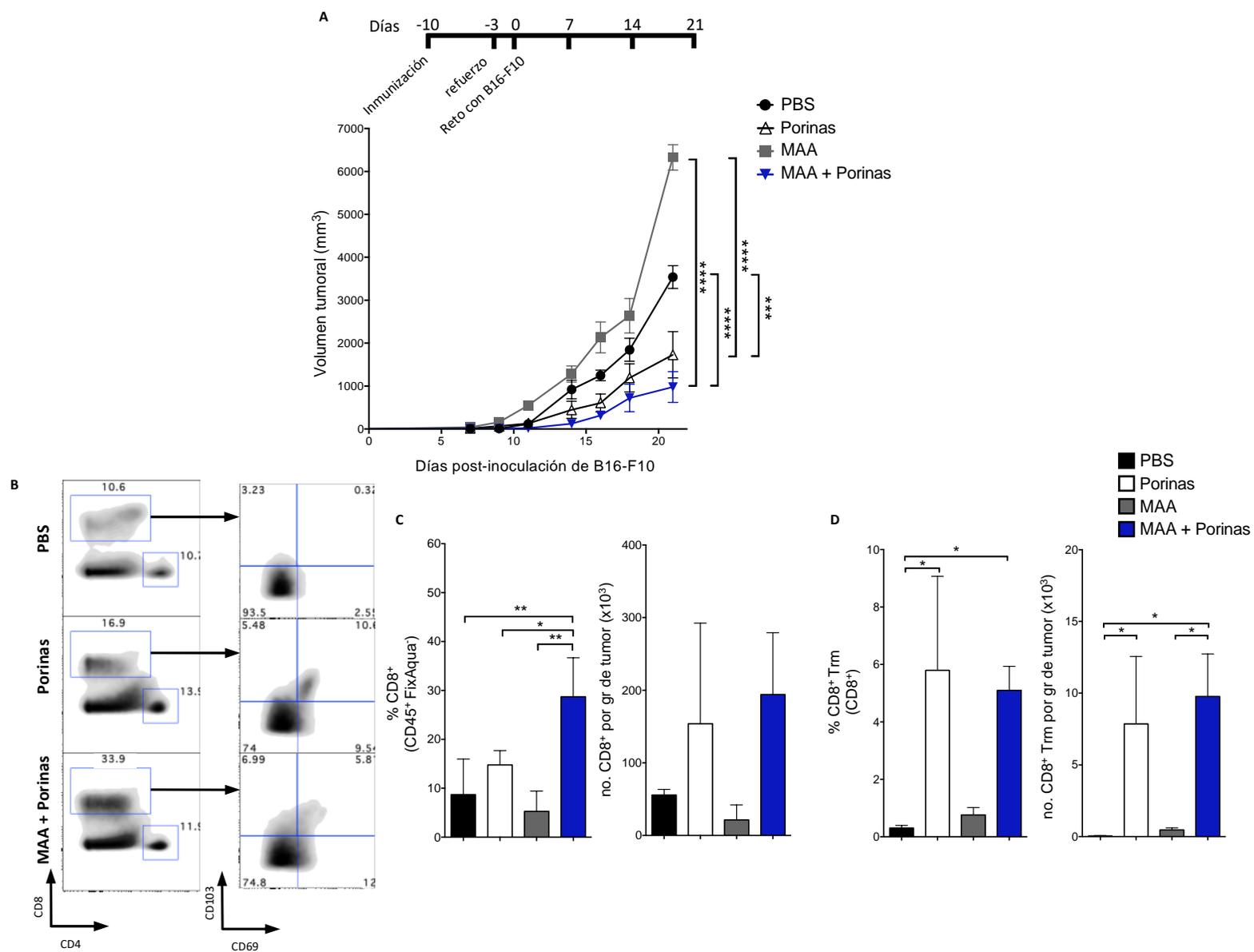


Figura 8. La inmunización con Porinas induce linfocitos CD8⁺ Trm que responden a antígenos naturales de melanoma que controlan el crecimiento. (A) Ratones fueron inmunizados s.c. con Porinas y dos MAA (TRP-2 y gp-100), 10 y 3 días antes del reto con B16-F10. **(B)** Análisis de linfocitos Trm provenientes de TILs CD8⁺ por citometría de flujo. Frecuencia y números absolutos por masa tumoral de TILs CD8⁺ **(C)** y CD8⁺ Trm **(D)**. Datos agrupados de dos experimentos independientes con 5 ratones por cada grupo. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

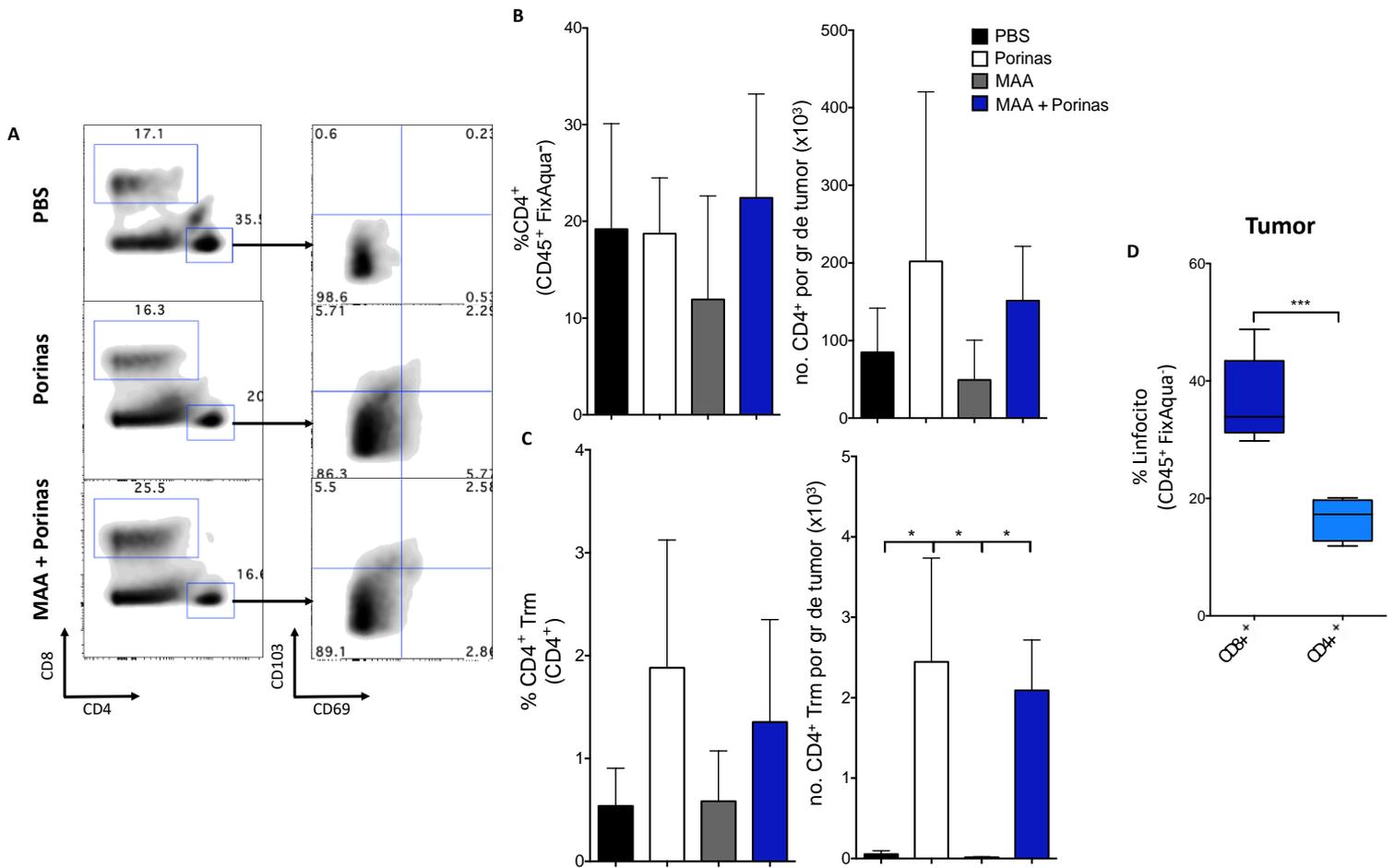


Figura 9. Las Porinas inducen linfocitos CD4⁺ Trm en un modelo de antígenos naturales de melanoma. Ratones fueron inmunizados s.c. con Porinas y dos MAA (TRP-2 y gp-100), 10 y 3 días antes del reto con B16-F10. **(A)** Análisis de linfocitos Trm provenientes de TILs CD4⁺ por citometría de flujo. Frecuencia y números absolutos por masa tumoral de TILs CD4⁺ **(B)** y CD4⁺ Trm **(C)**. **(D)** Comparación de la frecuencia entre linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ infiltrantes de tumor. Datos agrupados de dos experimentos independientes con 5 ratones por cada grupo. * p < 0.05, *** p < 0.001.

Considerando que nuestros resultados sugieren que el control del crecimiento tumoral es dependiente de los linfocitos encontrados en el estroma tumoral (**Fig. 6 y 7**), se determinó la presencia de TILs en los tumores de los ratones inmunizados. A pesar de que en el grupo de MAA + Porinas se observa un mayor porcentaje de linfocitos T CD8⁺, la densidad de esta población en el tumor fue similar a los otros grupos (**Fig. 8B,C**).

De forma notable, se pudo observar que la formación de linfocitos CD8⁺ Trm solamente fue apreciada en los grupos MAA + Porinas y las Porinas solas (**Fig. 8B,D**), lo que coincide con que estos son los grupos en donde se observó un mejor control en el crecimiento tumoral (**Fig. 8A**). No se encontró una diferencia entre los grupos en la respuesta de TILs CD4⁺ (**Fig. 9A,B**), pero la formación de linfocitos CD4⁺ Trm también se observó únicamente en los grupos que controlaron el crecimiento tumoral (**Fig. 9C**), aunque nuevamente su frecuencia fue significativamente menor comparada con la respuesta CD8 (**Fig. 9D**). Estos resultados muestran la que la utilización de las Porinas como adyuvante se puede extender para inducir una respuesta contra antígenos asociados a melanoma, así como también la correlación que existe entre la formación de linfocitos Trm y el control del crecimiento tumoral.

5. *Las Porinas inducen una protección tumoral más eficiente comparado con la subunidad B de la toxina del cólera.*

Para poner en contexto el efecto de adyuvante de las Porinas (PAMP clásico) con otro adyuvante, se comparó contra la CTB (PAMP no clásico). En nuestro equipo de trabajo se reportó que la CTB promueve la formación de linfocitos Trm que protegen contra el melanoma (63). Los ratones fueron inmunizados profilácticamente con los diferentes adyuvantes y 7 días después retados con el melanoma MO4 (**Fig. 10A**, arriba). Se observó que las Porinas y la CTB exhiben una protección profiláctica retrasando el crecimiento tumoral comparado con los grupos control. Sin embargo, se observó un mejor control de el crecimiento tumoral con la OVA + Porinas, el cual fue significativo, comparado con todos

los demás grupos, determinado por el volumen tumoral y porcentaje de ratones libres de tumor (Fig. 10A, abajo).

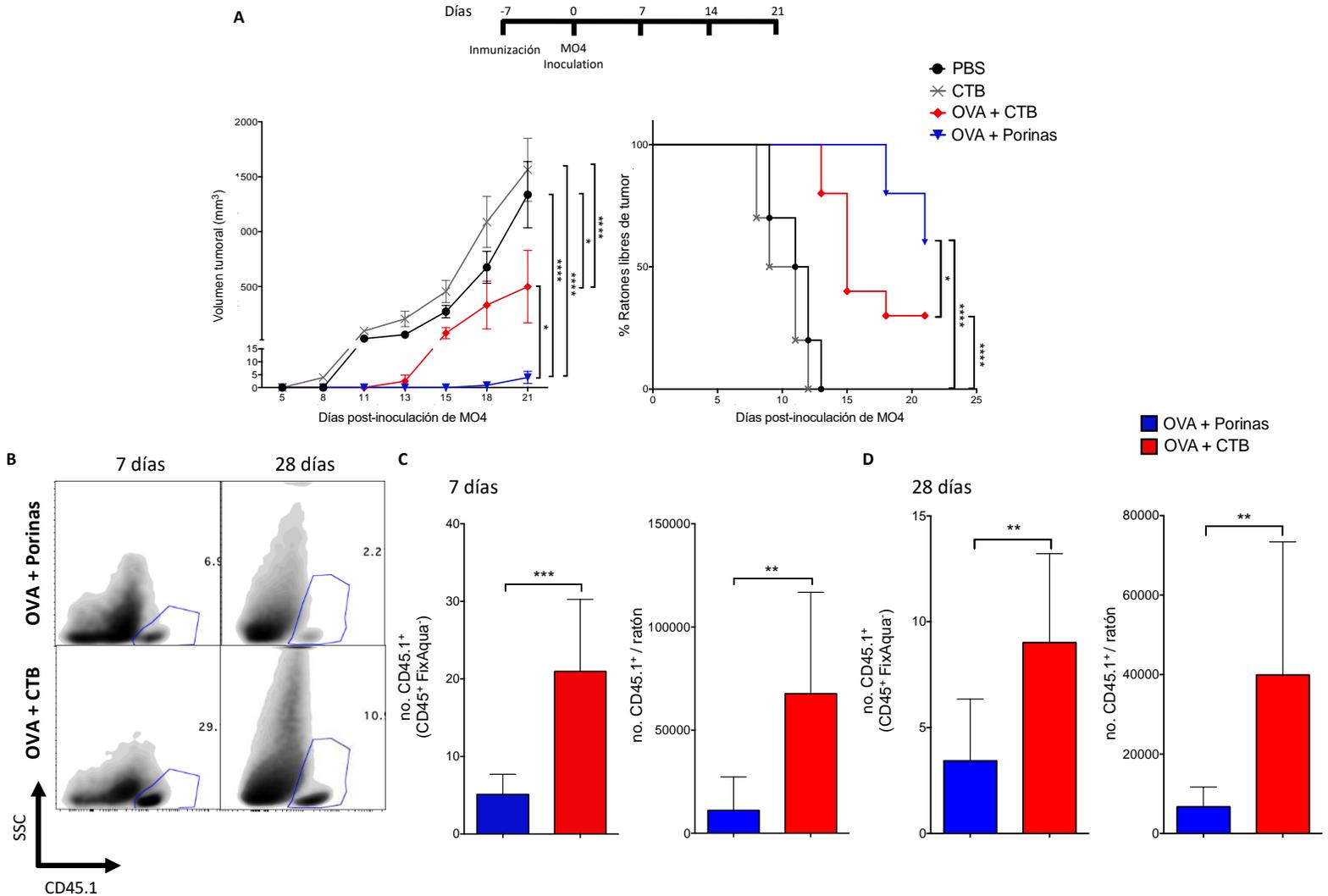


Figura 10. Las Porinas como adyuvante controla mejor el crecimiento tumoral que la subunidad B de la toxina del cólera. (A) Ratones fueron inmunizados s.c. con OVA + Porinas u OVA + CTB y los controles: CTB y PBS. Después de 7 días fueron retados con MO4, anotando el volumen tumoral y los ratones libres de tumor. Ratones CD45.2⁺ fueron transferidos i.v. con linfocitos T CD8⁺ CD45.1⁺ (OT-I) y linfocitos T CD4⁺ CD45.1⁺ (OT-II) OVA-específicos y al día siguiente inmunizados i.d. en ambas orejas con OVA + Porinas o con los grupos control, comparando las inmunizaciones OVA + Porinas y OVA + CTB. (B) Análisis de la expansión de linfocitos CD45.1⁺ en la piel a los días 7 y 28 mediante citometría de flujo. Frecuencia y números absolutos de linfocitos CD45.1⁺ a los días 7 (C) y 28 (D). Datos agrupados de tres experimentos independientes con 3-4 ratones por cada grupo. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

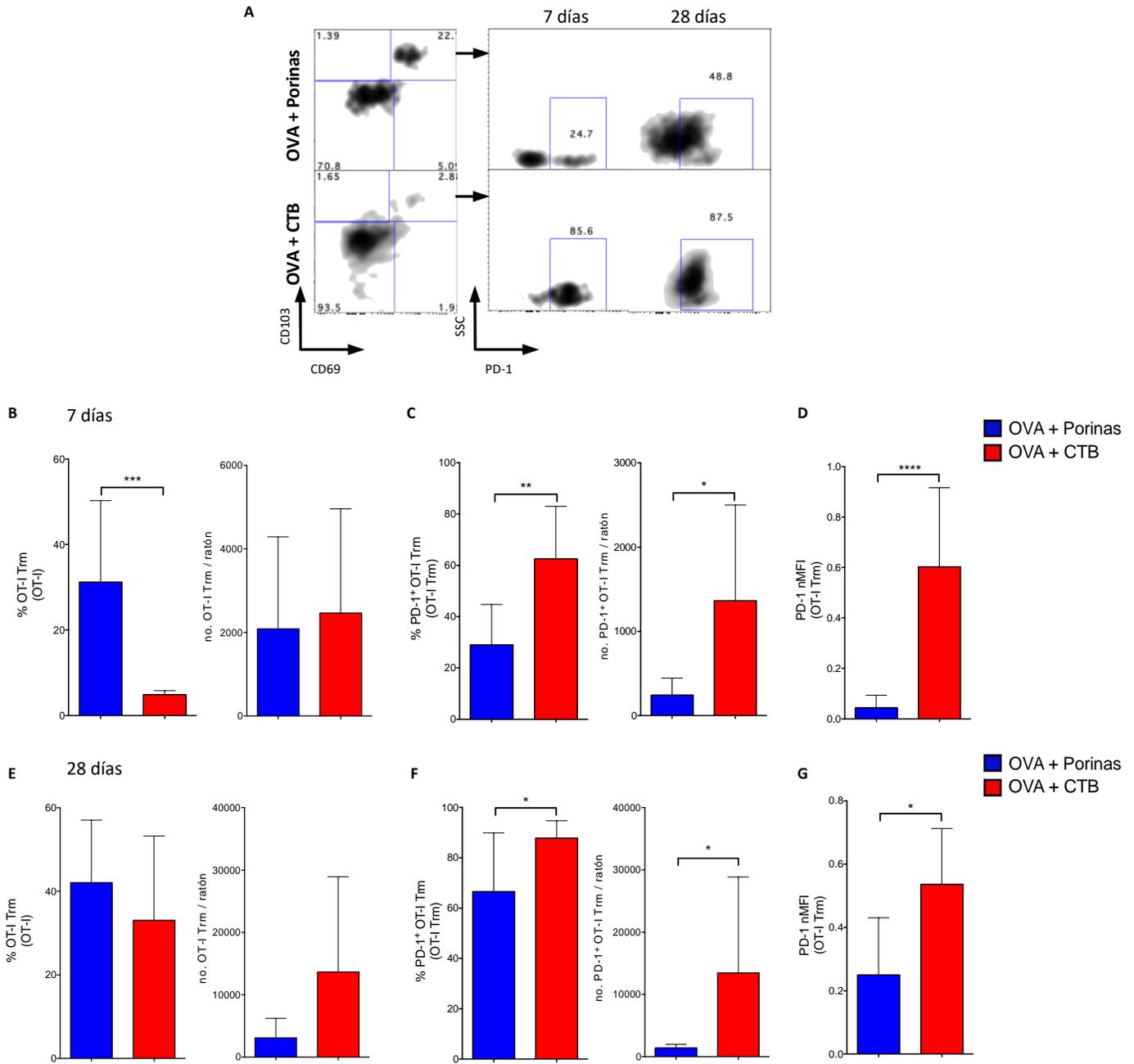


Figura 11. Las Porinas inducen linfocitos OT-I Trm con baja expresión de PD-1 comparado con la CTB. Ratones CD45.2⁺ fueron transferidos i.v. con linfocitos T CD8⁺ CD45.1⁺ (OT-I) y linfocitos T CD4⁺ CD45.1⁺ (OT-II) OVA-específicos y al día siguiente inmunizados i.d. en ambas orejas con OVA + Porinas o con los grupos control, comparando las inmunizaciones OVA + Porinas y OVA + CTB. (A) Análisis de linfocitos OT-I Trm y su población PD-1⁺ por citometría de flujo. Frecuencia y números absolutos de linfocitos OT-I Trm y PD-1⁺ OT-I Trm 7 (B,C) y 28 (E,F) días después de la inmunización. La intensidad media de fluorescencia normalizada (nMFI) de PD-1 de los linfocitos OT-I Trm al día 7 (D) y 28 (G) después de la inmunización. Datos agrupados de tres experimentos independientes con 3-4 ratones por cada grupo. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Para una mejor comprensión en la relevancia de los linfocitos T de memoria, se comparó la capacidad de generar linfocitos CD8⁺ Trm por las Porinas y por la CTB, anticipándose una mayor respuesta en el grupo de OVA + Porinas por la mejor protección tumoral observada. También se determinó la expresión de PD-1 como un indicador de agotamiento temprano en linfocitos infiltrantes de piel, transfiriendo adoptivamente linfocitos OT-IxCD45.1⁺ y OT-IIxCD45.1⁺.

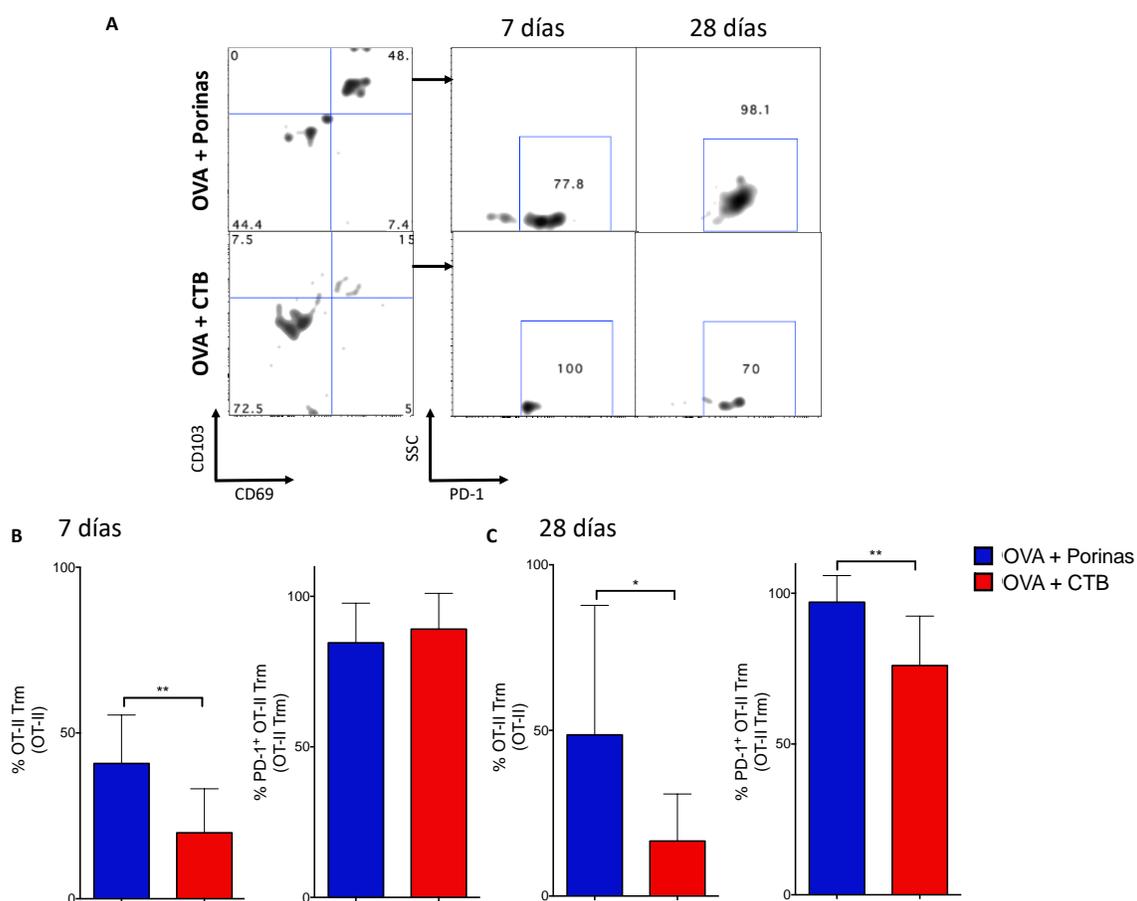


Figura 12. Las Porinas inducen linfocitos OT-II Trm con mayor expresión de PD-1 comparado con la CTB. Ratones CD45.2⁺ fueron transferidos i.v. con linfocitos T CD8⁺ CD45.1⁺ (OT-I) y linfocitos T CD4⁺ CD45.1⁺ (OT-II) OVA-específicos y al día siguiente inmunizados i.d. en ambas orejas con OVA + Porinas o con los grupos control, comparando las inmunizaciones OVA + Porinas y OVA + CTB. **(A)** Análisis de linfocitos OT-II Trm y su población PD-1⁺ por citometría de flujo. Frecuencia de linfocitos OT-I Trm y PD-1⁺ OT-I Trm 7 **(B)** y 28 **(C)** días después de la inmunización. Datos agrupados de tres experimentos independientes con 3-4 ratones por cada grupo. * p < 0.05, ** p < 0.01.

En los ratones inmunizados con OVA + CTB se observó a los 7 y 28 días una expansión significativamente mayor de linfocitos infiltrantes de piel CD45.1⁺ comparado con la inmunización OVA + Porinas (**Fig. 10B-D**). Además, se apreció con la inmunización OVA + Porinas una mayor eficiencia en la formación de linfocitos OT-I Trm comparado con OVA + CTB al día 7 (**Fig. 11A,B**), aunque no se reflejó en los números absolutos por la superior expansión de linfocitos CD45.1⁺ por la CTB (**Fig. 10C**). Interesantemente, se pudo observar a los 7 días que los linfocitos OT-I Trm inducidos por las Porinas tienen un porcentaje y número de células PD-1⁺ menor a los inducidos por la CTB (**Fig. 11A,C**), corroborándose también por la menor intensidad media de fluorescencia (MFI) de PD-1 comparado con la CTB (**Fig. 11D**). Al día 28 después de la inmunización se observó un patrón similar (**Fig. 11E-G**), sugiriendo que la mejor protección conferida por la OVA + Porinas podría ser debida a los bajos números de linfocitos PD-1⁺ OT-I Trm. Por el contrario, aunque la frecuencia de los linfocitos OT-II Trm es mayor con la inmunización con las Porinas comparado con la CTB (**Fig. 12A**), ambos adyuvantes inducen una alta frecuencia de linfocitos PD-1⁺ OT-II Trm al día 7 (**Fig. 12B**), siendo al día 28 mayor la inducida por las Porinas (**Fig. 12C**). En resumen, aunque la CTB promueve una expansión mayor de linfocitos T OVA-específicos en la piel, las Porinas son capaces de inducir eficientemente una población de linfocitos CD8⁺ Trm con una baja expresión de PD-1, y probablemente por esta diferencia temprana de agotamiento, las Porinas promueven un control del melanoma más eficiente.

6. *Las Porinas inducen linfocitos Trm con un fenotipo progenitor exhausto que correlaciona con la protección tumoral.*

Considerando que las inmunizaciones con los adyuvantes Porinas y CTB proveen un modelo para comparar la inducción de poblaciones que protegen contra el melanoma, se comparó la capacidad de ambos adyuvantes en inducir linfocitos T endógenos sin la utilización de la transferencia adoptiva (63). Con este fin, primero se comparó la protección terapéutica contra el melanoma MO4 dada por las inmunizaciones OVA + Porinas y OVA + CTB, observándose nuevamente una mejor protección con las Porinas (**Fig. 13A**). Después se determinó si las Porinas y la CTB pueden inducir una respuesta funcional analizando la formación de linfocitos T productores de IFN- γ , función asociada a linfocitos T terminalmente exhaustos (127,128). De hecho, se observaron TILs CD8⁺ productoras de IFN- γ en ambas inmunizaciones, lo cual no se aprecia en el control PBS (**Fig. 13B**). El análisis por citometría de flujo de los TILs CD8⁺ mostró en la inmunización OVA + CTB una frecuencia de linfocitos PD-1⁺ mayor comparado con OVA + Porinas, aunque esta diferencia no se reflejó en números absolutos (**Fig. 13C,D**). Cuando se evaluó la presencia de linfocitos T terminalmente exhaustos, se apreciaron TILs CD8⁺ que co-expresan PD-1 y TIM-3 en ambas inmunizaciones, sin haber una diferencia en la expresión de TIM-3 entre ellas (**Fig. 13E,F**). Importantemente, se confirmó la funcionalidad de los linfocitos T TIM-3⁺ CD8⁺ por medio de la expresión de IFN- γ y GZMB, sin apreciarse alguna diferencia entre ambas inmunizaciones (**Fig. 14A,B**). La secreción de IFN- γ y GZMB ha sido previamente asociada con linfocitos T terminalmente exhaustos (127,128).

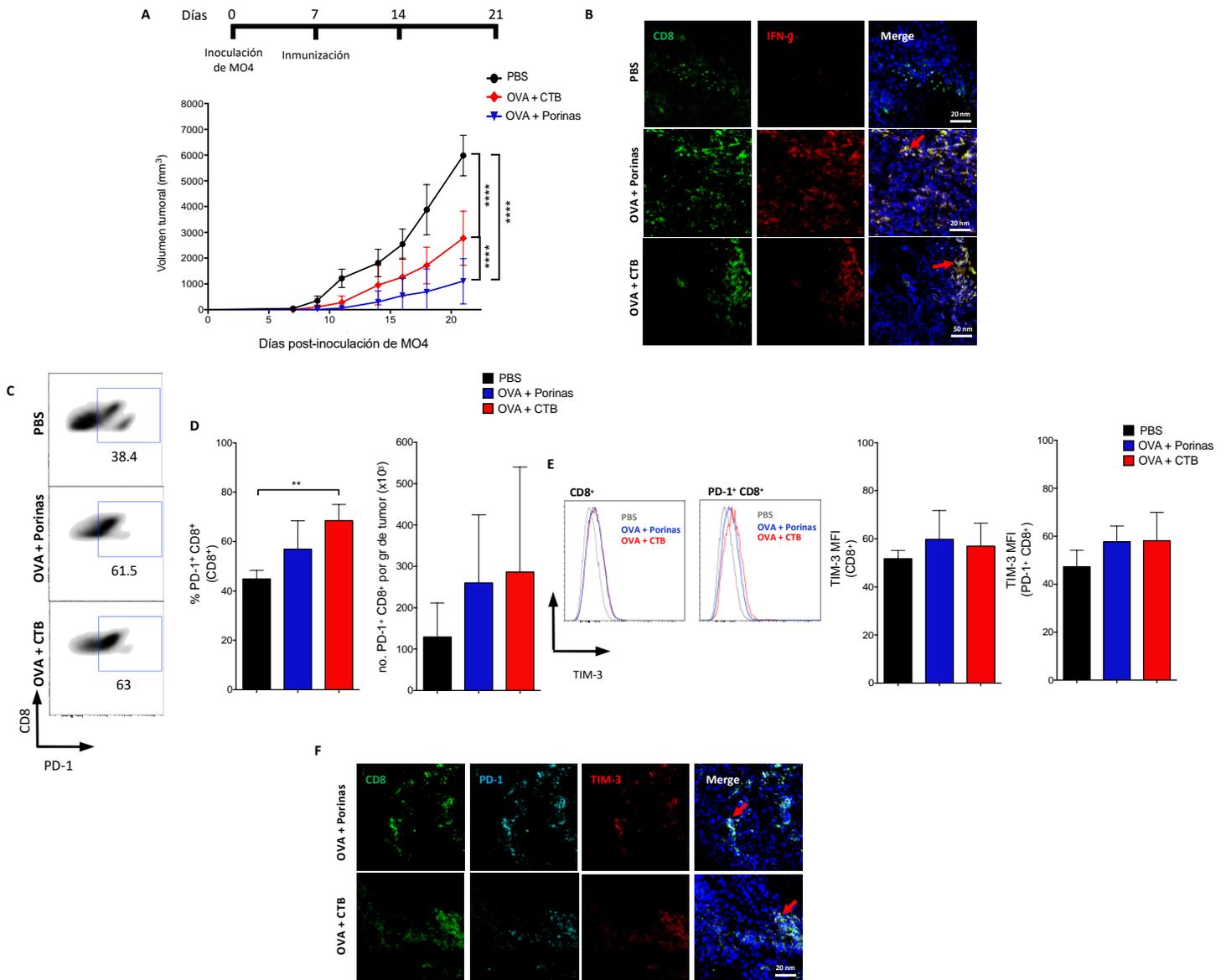


Figura 13. Las Porinas y CTB inducen linfocitos T TIM-3⁺ PD-1⁺ CD8⁺ en el estroma tumoral. (A) Ratones fueron inoculados con MO4 e inmunizados s.c. 7 días después con OVA + Porinas u OVA + CTB, o con el control PBS, y se les dio seguimiento del crecimiento tumoral hasta el día 21. (B) TILs CD8⁺ (verde) IFN- γ ⁺ (rojo) (micrografía de inmunofluorescencia representativa de una zona aumentada) (barra de escala = 20 μ m) (flechas rojas muestran ejemplos representativos). (C) Citometría de flujo de TILs PD-1⁺ CD8⁺ y (D) sus frecuencias y números absolutos por masa tumoral. (E) La intensidad media de fluorescencia (MFI) de TIM-3 de TILs CD8⁺ y PD-1⁺ CD8⁺. (F) TILs CD8⁺ (verde) que expresan PD-1 (cian) y TIM-3 (rojo) (micrografía de inmunofluorescencia representativa de una zona aumentada) (barra de escala = 20 μ m) (flechas rojas muestran ejemplos representativos). Datos agrupados de tres experimentos independientes con 3-4 ratones por cada grupo. **, p < 0.01, **** p < 0.0001.

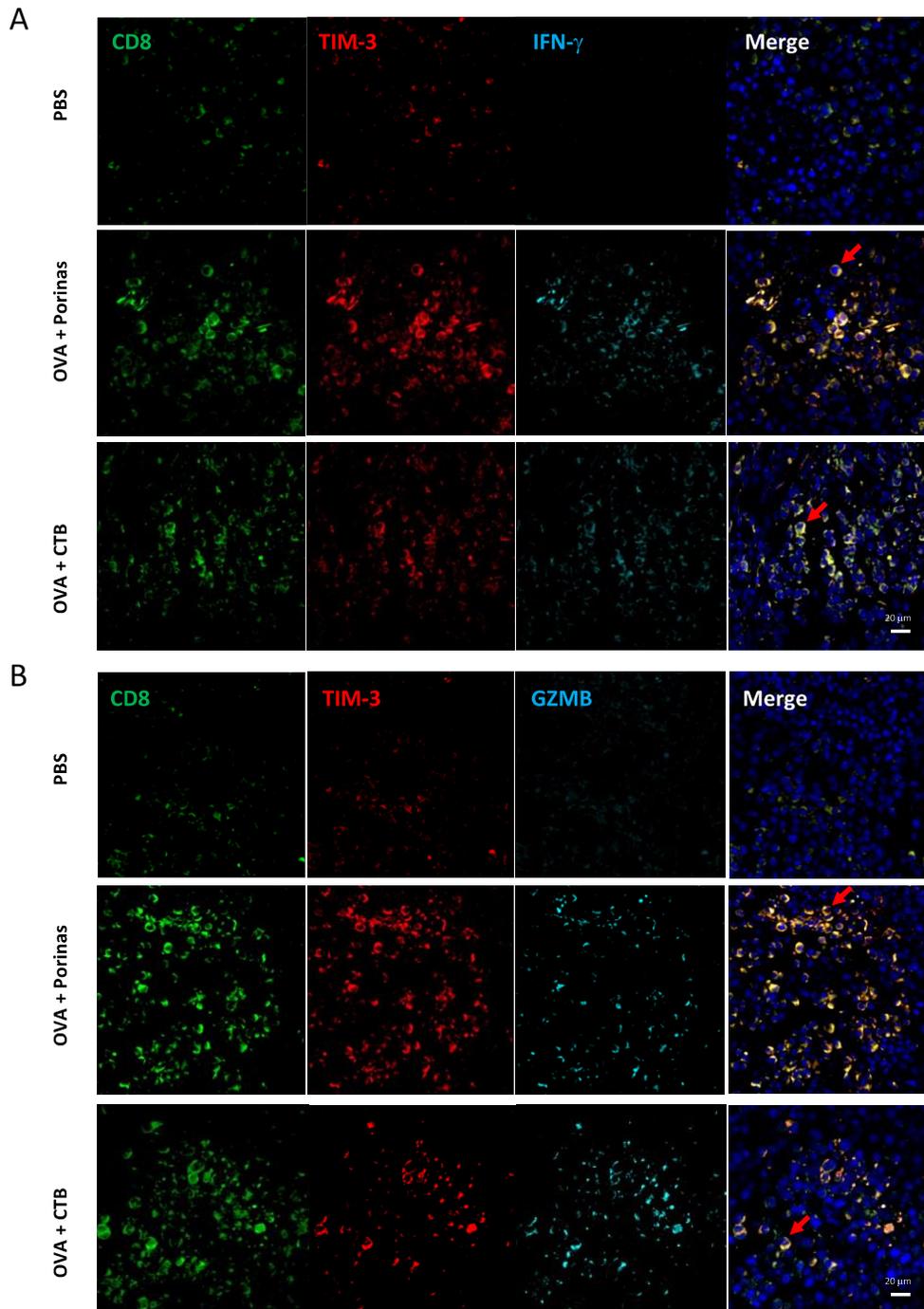


Figura 14. Las Porinas y CTB inducen linfocitos T TIM-3⁺ PD-1⁺ CD8⁺ funcionales en el estroma tumoral. Ratones fueron inoculados con MO4 e inmunizados s.c. 7 días después con OVA + Porinas u OVA + CTB, o con el control PBS, y se les dio seguimiento del crecimiento tumoral hasta el día 21. TILs CD8⁺ (verde) TIM-3⁺ (rojo) que expresan IFN- γ (cyan) (A) o GZMB (cyan) (B) (micrografía de inmunofluorescencia representativa de una zona aumentada) (barra de escala = 20 μ m) (flechas rojas muestran ejemplos representativos).

También se evaluó el fenotipo terminalmente exhausto en los ratones inmunizados con MAA + Porinas y las Porinas solas, apreciándose que solamente la inmunización MAA + Porinas fue capaz de inducir TILs CD8⁺ y TILs CD8⁺ Trm que co-expresan PD-1 y TIM-3 (**Fig. 15A,B**), población previamente documentada (98,109). Cabe mencionar que la presencia de linfocitos TIM-3⁺ PD-1⁺ CD8⁺ Trm no correlaciona con el control del crecimiento tumoral (**Fig. 15B** y **Fig. 8A**).

Tomando en cuenta que los TILs terminalmente exhaustos inducidos por las Porinas no mostraron una correlación con la protección, se evaluaron los TILs CD8⁺ con un fenotipo progenitor exhausto analizando la expresión de TCF-1. Mediante la inmunofluorescencia de las células presentes en el estroma tumoral se pudo observar linfocitos T TCF-1⁺ CD8⁺ solamente con la inmunización OVA + Porinas (**Fig. 16A**). En la inmunización OVA + Porinas se observó un incremento en la MFI de TCF-1 de los TILs CD8⁺ y TILs PD-1⁺ CD8⁺, pero sin una diferencia significativa comparada con OVA + CTB (**Fig. 16B**). Considerando la alta expresión de TCF-1 por los TILs CD8⁺ inducidos por las Porinas, se evaluó si el fenotipo progenitor exhausto derivaba de la población Trm. En los ratones inmunizados con OVA + Porinas se observó una mayor infiltración de linfocitos CD8⁺ Trm en el tumor comparado con los ratones inmunizados con OVA + CTB (**Fig. 16C,D**). De manera similar, las Porinas inducen una mayor formación de linfocitos PD-1⁺ CD8⁺ Trm en el tumor comparado con CTB (**Fig. 16C,E**). Interesantemente, los TILs que expresan TCF-1 corresponden a los linfocitos PD-1⁺ CD8⁺ Trm, únicamente observados en ratones inmunizados con OVA + Porinas (**Fig. 16F,G**), corroborado también por el MFI de TCF-1 (**Fig. 14H**).

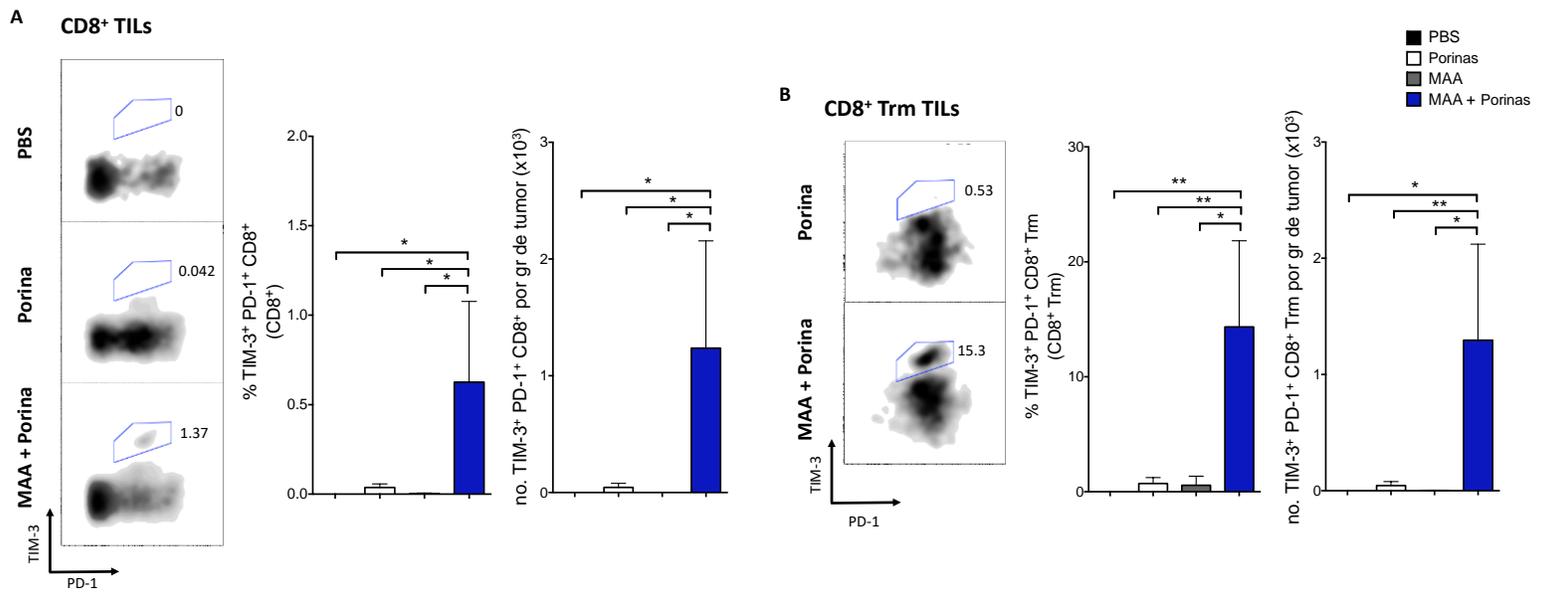


Figura 15. La inmunización con Porinas induce linfocitos CD8⁺ Trm con un fenotipo terminalmente exhausto. Ratones fueron inmunizados s.c. con Porinas y dos MAA (TRP-2 y gp-100), 10 y 3 días antes del reto con B16-F10. Análisis de linfocitos T terminalmente exhaustos provenientes de TILs CD8⁺ (A) y CD8⁺ Trm (B) por citometría de flujo, con su frecuencia y números absolutos por masa tumoral. Datos agrupados de dos experimentos independientes con 5 ratones por cada grupo. * p < 0.05, ** p < 0.01.

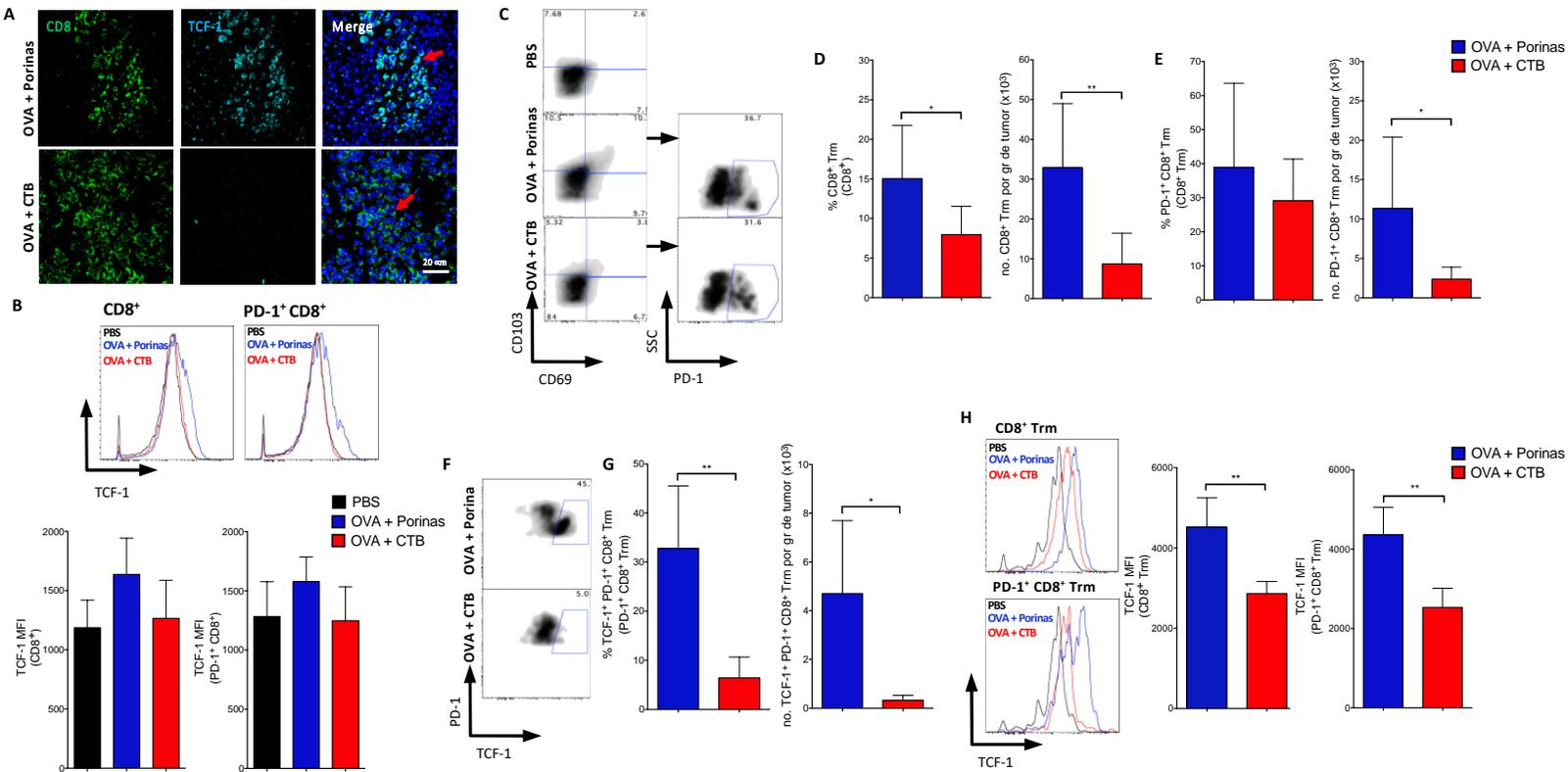


Figura 16. Las Porinas inducen linfocitos TCF-1⁺ PD-1⁺ CD8⁺ Trm en el estroma tumoral. Ratones fueron inoculados con MO4 e inmunizados s.c. 7 días después con OVA + Porinas u OVA + CTB, o con el control PBS, y se les dio seguimiento del crecimiento tumoral hasta el día 21. **(A)** TILs CD8⁺ (verde) TCF-1⁺ (cyan) (micrografía de inmunofluorescencia representativa de una zona aumentada) (barra de escala = 20 μm) (flechas rojas muestran ejemplos representativos). **(B)** MFI de TCF-1 proveniente de TILs CD8⁺ y PD-1⁺ CD8⁺. **(C)** Análisis por citometría de flujo de linfocitos PD-1⁺ CD8⁺ Trm. Frecuencia y números absolutos por masa tumoral de linfocitos CD8⁺ Trm **(D)** y linfocitos PD-1⁺ CD8⁺ Trm **(E)**. Análisis de TILs CD8⁺ Trm progenitor exhaustos (TCF-1⁺ PD-1⁺) **(F)** y su frecuencia y números absolutos por masa tumoral **(G)**. **(H)** MFI de TCF-1 proveniente de TILs CD8⁺ Trm y PD-1⁺ CD8⁺ Trm. Datos agrupados de tres experimentos independientes con 3-4 ratones por cada grupo. * p < 0.05, ** p < 0.01.

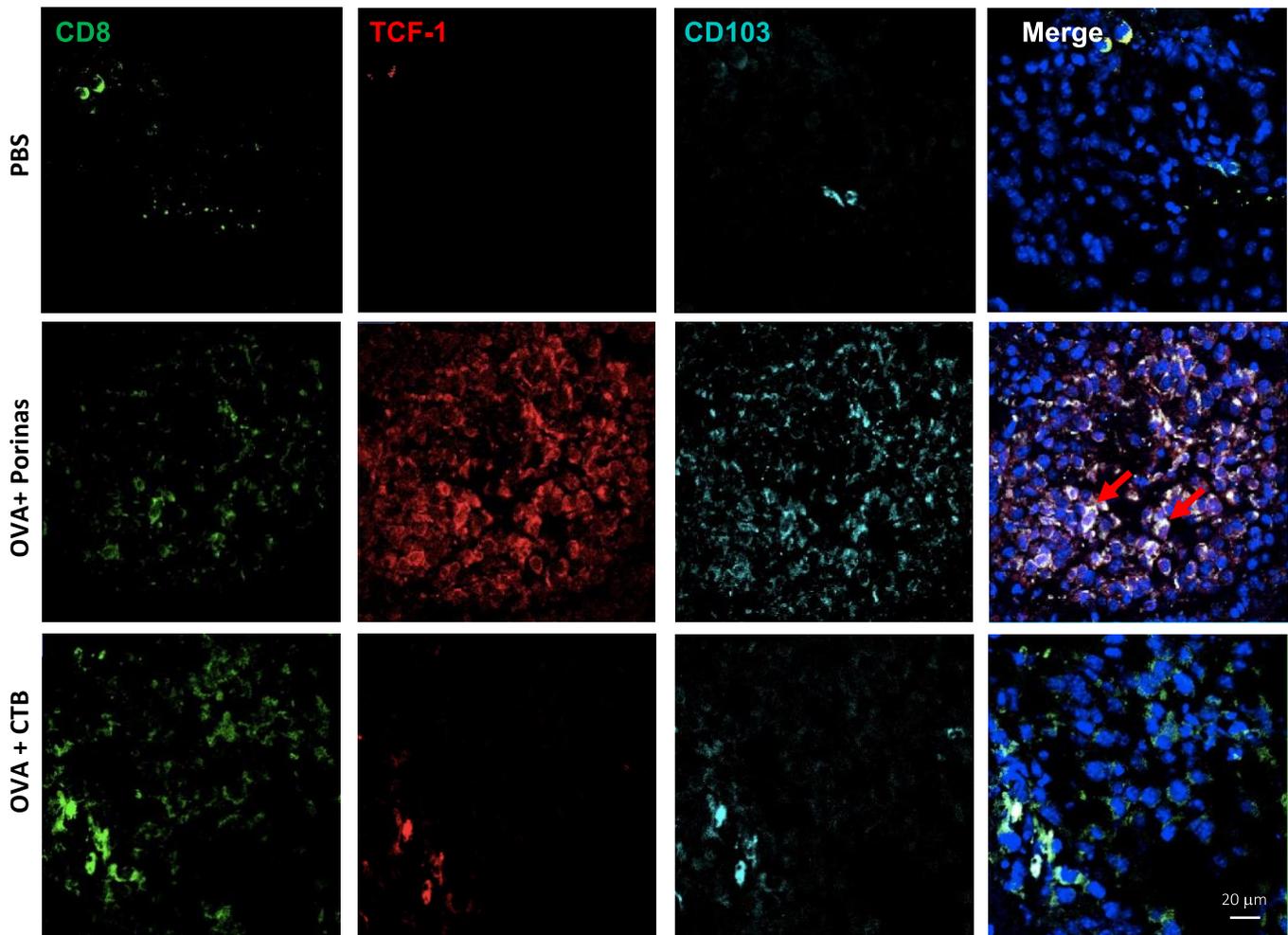


Figura 17. Las Porinas inducen linfocitos CD8⁺ Trm con un fenotipo progenitor en el estroma tumoral. Ratones fueron inoculados con MO4 e inmunizados s.c. 7 días después con OVA + Porinas u OVA + CTB, o con el control PBS, y se les dio seguimiento del crecimiento tumoral hasta el día 21. TILs CD8⁺ (verde) TCF-1⁺ (rojo) CD103 (cyan) (micrografía de inmunofluorescencia representativa de una zona aumentada) (barra de escala = 20μm) (flechas rojas muestran ejemplos representativos).

Esta población también se evidenció por medio de IF, donde se aprecian linfocitos T TCF-1⁺ CD103⁺ CD8⁺ en el estroma tumoral de los ratones inmunizados con OVA + Porinas (**Fig. 17**). Estos resultados demuestran que las Porinas inducen linfocitos CD8⁺ Trm con fenotipo progenitor exhausto, el cual correlaciona con el control del crecimiento tumoral.

7. *Los linfocitos Trm con un fenotipo progenitor exhausto inducidos por las Porinas correlacionan con la cooperación de la inmunoterapia anti-PD-1.*

Considerando que los TILs con un fenotipo progenitor exhausto tienen la capacidad de responder al bloqueo de PD-1 (127,132), se evaluó si los linfocitos T TCF-1⁺ PD-1⁺ CD103⁺ inducidos con las Porinas, con fenotipo de progenitor exhausto, podrían responder a una inmunoterapia anti-PD-1. Con este fin, se administraron tres dosis de mAb anti-PD-1 a los días 19, 21 y 23 en los ratones terapéuticamente inmunizados con OVA + Porinas o OVA + CTB (**Fig. 18A**, arriba) (127). Para este experimento la inmunoterapia fue ejecutada solamente en los ratones que tuvieron tumores de tamaños similares en ambas inmunizaciones, para así comparar solamente el microambiente tumoral modificado por los diferentes adyuvantes ante el bloqueo de PD-1.

Los resultados muestran que el crecimiento tumoral de los ratones inmunizados con OVA + CTB no fue modificada por los mAb anti-PD-1, en contraste, en los ratones inmunizados con OVA + Porinas el bloqueo de PD-1 retrasa significativamente el crecimiento tumoral (**Fig. 18A**, abajo). Estos hallazgos evidencian que las Porinas promueven la formación de linfocitos CD8⁺ Trm con un fenotipo y función de progenitor exhausto capaces de responder al bloqueo de PD-1.

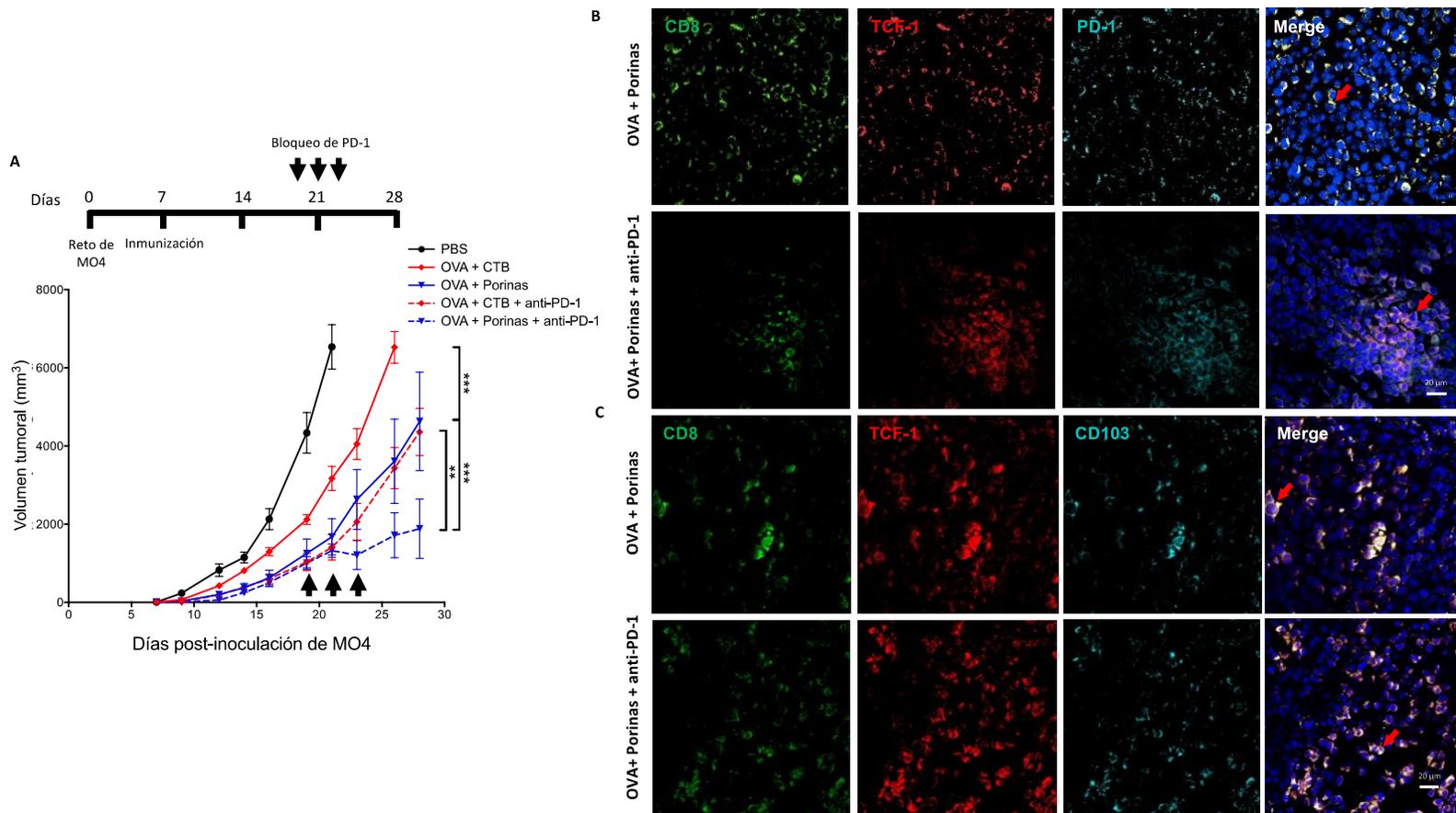


Figura 18. La presencia de linfocitos $CD8^+$ Trm con un fenotipo progenitor exhausto correlaciona con la respuesta a la inmunoterapia anti-PD-1. (A) Ratones fueron inoculados con MO4 e inmunizados s.c. 7 días después con OVA + Porinas u OVA + CTB, o con el control PBS, y luego tratados i.p. con mAb anti-PD-1 (flechas), se les dio seguimiento su crecimiento tumoral hasta el día 28. TILs $CD8^+$ (verde) $TCF-1^+$ (rojo) que expresan PD-1 (cyan) (B) o CD103 (cyan) (C) provenientes de los tumores de ratones inmunizados con OVA + Porinas con o sin anti-PD-1 mAb (micrografía de inmunofluorescencia representativa de una zona aumentada) (barra de escala = $20\mu m$) (flechas rojas muestran ejemplos representativos). Datos agrupados de tres experimentos independientes con 3-4 ratones por cada grupo. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

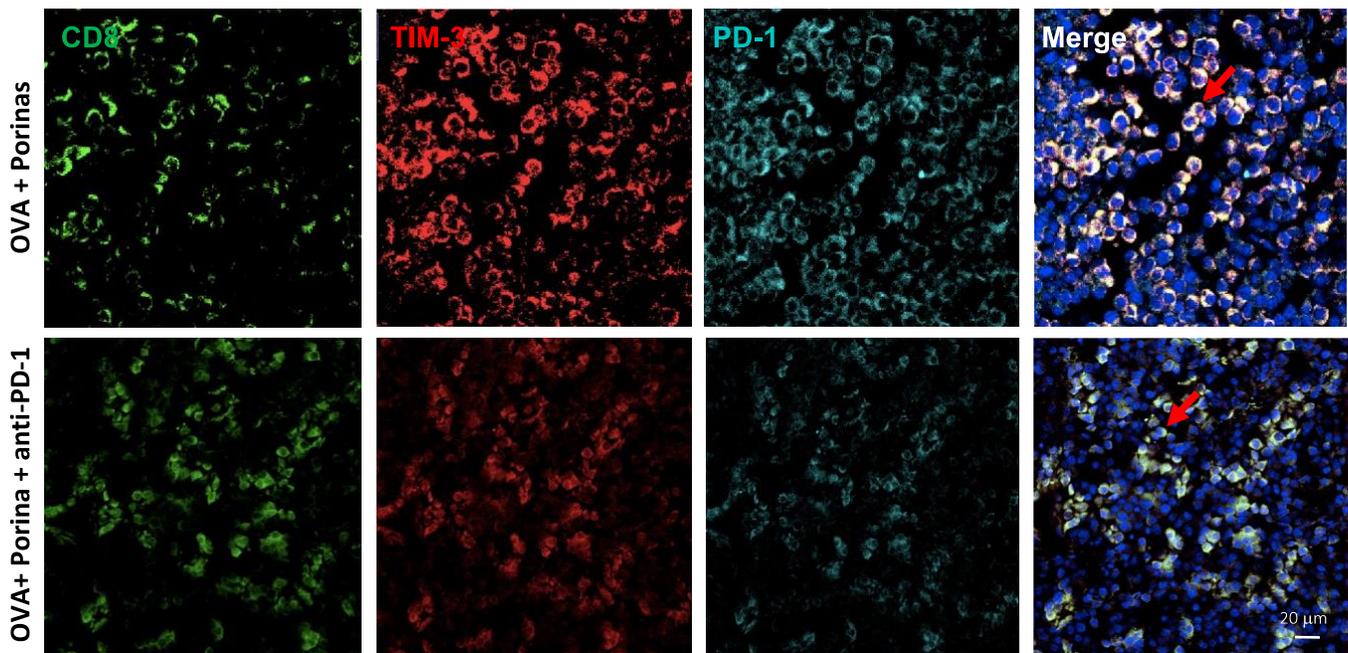


Figura 19. Los linfocitos T CD8⁺ terminalmente exhaustos inducidos por las Porinas no se modifican con el bloqueo de PD-1. Ratones fueron inoculados con MO4 e inmunizados s.c. 7 días después con OVA + Porinas u OVA + CTB, o con el control PBS, y luego tratados i.p. con mAb anti-PD-1. TILs CD8⁺ (verde) TIM-3⁺ (rojo) PD-1⁺ (cyan) provenientes de los tumores de ratones inmunizados con OVA + Porinas con o sin anti-PD-1 mAb (micrografía de inmunofluorescencia representativa de una zona aumentada) (barra de escala = 20 μm) (flechas rojas muestran ejemplos representativos).

Estos resultados indican que existe una clara diferencia entre las inmunizaciones en la generación de linfocitos PD-1⁺ CD8⁺ Trm que expresan TCF-1, siendo las Porinas el adyuvante capaz de inducirlos a comparación de la CTB (**Fig. 16F,G**). Considerando lo anterior, se evaluó la formación de linfocitos T TCF-1⁺ en los ratones inmunizados con las Porinas con o sin el bloqueo de PD-1, para analizar el cambio que induce la terapia anti-PD-1 en esta población. En los ratones inmunizados con OVA + Porinas y tratados con mAb anti-PD-1 se pudo observar en el estroma tumoral la formación de agrupaciones de linfocitos TCF-1⁺ PD-1⁺ CD8⁺ (**Fig. 18B**), así también el incremento de linfocitos TCF-1⁺ CD103⁺

CD8⁺ (**Fig. 18C**), sugiriendo la expansión de esta población en respuesta a la inmunoterapia. En contraste, la frecuencia de linfocitos TIM-3⁺ PD-1⁺ CD8⁺ no se vio alterada después del bloqueo de PD-1 en los ratones inmunizados con OVA + Porinas (**Fig. 19**). Tomando en cuenta todos estos hallazgos, se sugiere fuertemente la importancia del papel de los linfocitos CD8⁺ Trm progenitor exhausto en el control del melanoma, independientemente o en cooperación con la inmunoterapia anti-PD-1.

DISCUSIÓN

Hoy en día la inmunoterapia más efectiva para tratar a los pacientes con melanoma es el bloqueo de PD-1, sin embargo, la respuesta ante esta terapia depende de la presencia de TILs. La presencia de linfocitos T CD8⁺ en el estroma tumoral ha sido tradicionalmente un marcador de buen pronóstico en diferentes tipos de cáncer (142). Recientemente se ha demostrado que la presencia de linfocitos Trm en el estroma tumoral es determinante en el control del crecimiento tumoral en melanoma. Se ha demostrado además que la presencia de linfocitos T CD8⁺ con fenotipo de progenitor exhausto es crucial en la protección y en la cooperación con la inmunoterapia anti-PD-1 en melanoma. Los hallazgos de este trabajo de tesis reportan que la inmunización utilizando a las Porinas como adyuvante, induce una respuesta antitumoral eficiente en un modelo de melanoma de ratón. Esta respuesta inducida por las Porinas es mediada por linfocitos CD8⁺ Trm con un fenotipo de progenitor exhausto que responden al bloqueo de PD-1. Por lo que la utilización de las Porinas como adyuvante resulta en una estrategia eficiente de inmunización para inducir una respuesta anti-tumoral, independiente o en cooperación con la inmunoterapia anti-PD-1 (**Fig. 20**).

Los primeros resultados obtenidos de este trabajo demostraron que las Porinas de *S. Typhi* son un adyuvante tipo PAMP eficiente en un modelo de melanoma en ratón, en una estrategia profiláctica y terapéutica. Estos hallazgos muestran el potencial para la utilización de las Porinas en el desarrollo de *cancer vaccines* como un adyuvante contra el melanoma. Se observó que la inmunización con las Porinas es capaz de inducir una respuesta de memoria circulante mediada por linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺, así como también linfocitos T productores de IFN- γ en ganglios, siendo la población de linfocitos T CD8⁺ la más abundante. Aunque la presencia de linfocitos T CD8⁺ es reportada como la más relevante en la respuesta anti-tumoral, la función de los linfocitos T CD8⁺ mejora con la cooperación de los linfocitos T CD4⁺ (73), por lo que es importante poder inducir ambas respuestas.

Un desafío más importante en estrategias de inmunización es inducir una respuesta de linfocitos Trm, ya que estos son capaces de llegar al tumor, establecerse y ejercer su función efectora. Se observó que las Porinas, en una inmunización en la piel, inducen eficientemente linfocitos Trm capaces de controlar el crecimiento tumoral, lo cual está de acuerdo con reportes previos (85,119). Interesantemente, las Porinas inducen una respuesta temprana de linfocitos Trm, ya que ésta respuesta se observa 7 días después de la inmunización. Este hallazgo es diferente a estudios previos, donde la llegada a piel de precursores de linfocitos Trm ante una infección viral, se observa después de 2 semanas, y luego es necesario que pasen 2 semanas más para la maduración de linfocitos Trm, fenotipo determinado por la co-expresión de CD103 y CD69 (80,84,91,92). Cabe mencionar que estos estudios fueron realizados en modelos virales, lo cual sugiere que una inmunización, utilizando el adyuvante que se utilizó en este trabajo, podría ser más eficiente en la inducción

de una respuesta Trm en piel. Al respecto de la respuesta Trm en el estroma tumoral, estudios previos han evaluado la presencia de esta población en el melanoma después de 4-5 semanas a una inmunización, basados en los reportes en modelos virales (85,119). Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la protección ante el reto tumoral podría ser por la inducción temprana en piel de linfocitos T, ya que se observó un control del crecimiento tumoral sin la participación de los linfocitos T circulantes, por lo que sería importante identificar si en el contexto de inmunización con las Porinas se observa una respuesta de Trm en el estroma tumoral a tiempos más tempranos. Se observó además que las Porinas fueron capaces de inducir linfocitos Trm a las 4 semanas, similar a lo reportado previamente (85,119), sin embargo, fue necesario un refuerzo para poder observar una respuesta anti-tumoral eficiente. Además, también se pudo observar una respuesta de memoria protectora de larga duración en ratones retados por segunda vez con melanoma, los cuales se mantuvieron libres de tumor por 70 días. Considerando lo anterior y lo reportado en relación a los precursores de los linfocitos Trm, es probable que la protección observada sea consecuencia de la expansión de linfocitos T de memoria en los nódulos linfáticos, que posteriormente se diferenciarán en linfocitos Trm funcionales en el estroma tumoral.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren fuertemente que la protección observada depende de la inducción de linfocitos Trm, ya que se ha reportado que el control del crecimiento tumoral en melanoma es completamente dependiente de la respuesta CD8 y parcialmente de CD4 (143). Esto concuerda con lo observado en los resultados de este trabajo de tesis, ya que la inmunización con las Porinas induce una mayor población de linfocitos T CD8⁺ al compararse con los linfocitos T CD4⁺, tanto en ganglio, piel y tumor. Considerando que la cooperación de los linfocitos T CD4⁺ aumenta la función efectora, expansión clonal y

disminución de ICPs en los linfocitos T CD8⁺ (73,74), la respuesta discreta mediada por linfocitos T CD4⁺ observada en nuestros resultados, pudo ser suficiente para cooperar con una respuesta efectora eficiente mediada por linfocitos T CD8⁺. En este escenario, el control tumoral se observó aún en la ausencia de los linfocitos T circulantes, sugiriendo que los linfocitos CD8⁺ Trm fueron los responsables, ya que los linfocitos Tem que pudiesen estar presentes en el tumor tienen el potencial de recircular y ser eliminados por la inoculación sistémica de anticuerpos anti-CD8 (63,85). En los distintos experimentos realizados en este trabajo, se apreció una correlación entre la formación de una respuesta Trm y el control del crecimiento tumoral, lo cual está en concordancia con estudios previos que demuestran que los linfocitos Trm son de gran relevancia en la respuesta anti-tumoral (85,96,109,144). Esta relación entre respuesta Trm y el control tumoral también se observó en linfocitos CD4⁺ Trm, lo cual también se observó en un reporte previo de nuestro grupo de investigación (63). Para confirmar estos hallazgos sería necesario realizar más experimentos que permitan comprobar de forma directa que la protección tumoral depende de linfocitos CD8⁺ Trm.

Interesantemente, los resultados de este trabajo pusieron en evidencia que la inducción de linfocitos Trm también depende del adyuvante que se utiliza, ya que la inmunización con las Porinas, comparada con la CTB, fue más eficiente en la formación temprana de linfocitos Trm, que además mostraron una menor expresión de PD-1 en la piel. Estas diferencias en la inducción de linfocitos Trm entre las Porinas y la CTB podrían explicarse por el mecanismo de activación de DCs por medio de los diferentes adyuvantes. La diferencia de efecto adyuvante podría ser por el tipo de moléculas a las cuales son agonistas, siendo las Porinas un PAMP clásico y la CTB un PAMP no clásico, ya que las Porinas son capaces de activar a las DCs por medio de los PRRs tipo Toll (TLR2 y TLR4),

mientras que la CTB no lo hace por medio de PRRs tipo Toll (NLRP3, FcR γ -CARD9, TREM2 y LMIR5) (43,55,56). El hecho que los dos adyuvantes estudiados en este trabajo de tesis tengan un mecanismo diferente de activar PRRs, podría dilucidar los mecanismos de activación necesarios para diferentes tipos de memoria T. Otro mecanismo para explicar las diferencias observadas entre los dos adyuvantes, podría ser la duración de la activación, donde se ha observado que las Porinas inducen una activación transitoria mientras que la CTB induce una activación sostenida de las DCs (43,63). La subpoblación DCs que se activan en el contexto del microambiente que inducen los dos adyuvantes utilizados en este trabajo podría también ser importante, ya que las DCs dependientes de Batf3 son requeridas para el desarrollo de la respuesta Trm (87), así como las citocinas y quimiocina secretadas, entre ellas IL-12, IL-15, CXCL9, CXCL10 y TGF- β (96). Esto además podría incidir con los requerimientos para inducir una respuesta progenitor exhausta, que aunque se ha reportado la firma transcriptómica de esta población (138), poco se sabe al respecto de su generación por medio de una inmunización (139). Es bien conocido que para la inducción de linfocitos con fenotipo exhausto la exposición crónica al antígeno es determinante (145). Recientemente se publicó un estudio que determina la importancia de la IL-2 para el fenotipo exhausto, mediante la activación persistente de STAT5 la cual impacta negativamente en la activación del receptor de arilo de carbono (146). Sería importante determinar en trabajos futuros si existe una selectividad por activar ciertas subpoblaciones de DCs y que moléculas se generan por medio de las Porinas o la CTB, para dilucidar más los mecanismos preferenciales para la inducción de linfocitos T con una memoria apta para tratar el cáncer u otra enfermedad. Sin embargo, estos hallazgos enfatizan la importancia de la selección correcta del adyuvante para el desarrollo de *cancer vaccines* y la complejidad de las

subpoblaciones de DCs y linfocitos Trm que participan en la inducción de inmunidad anti-tumoral protectora (147), destacando la eficiencia de las Porinas como adyuvante en el control anti-tumoral en melanoma.

Las observaciones descritas se basaron en estrategias de inmunización profilácticas con antígenos modelos, por lo que fue relevante también evaluar el uso de las Porinas como adyuvante en un modelo de melanoma que expresa antígenos endógenos del melanoma. En este modelo se observó que las Porinas pueden inducir linfocitos Trm infiltrantes de tumor con una estrategia de inmunización/refuerzo, utilizando dos MAAs (TRP-2 y gp100) como fuente de antígeno. De manera interesante, las Porinas solas con el esquema inmunización/refuerzo fueron capaces de inducir linfocitos Trm, resultando en una respuesta anti-tumoral efectiva contra un melanoma que expresan antígenos naturales. Estos resultados sugieren que los linfocitos Trm encontrados en el estroma tumoral tienen una especificidad contra antígenos endógenos. La posible explicación sería que las Porinas solas pudieran activar a las DCs, previo al reto con melanoma. Estos resultados nuevamente resaltan la importancia de inducir una respuesta Trm para el control tumoral mediante *cancer vaccines*. Añadiendo a lo anterior, el hecho de que los linfocitos Trm puedan expresar PD-1, tanto en piel como en tumor, y poder responder a su inhibición, es importante ver si la firma Trm podría ser utilizada como indicador de pronóstico. Existen reportes recientes que evalúan la firma Trm, así como también sus precursores y moléculas determinantes para este tipo de memoria (147), estos reportes así como los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los linfocitos Trm en los TILs podría ser un candidato importante para el bloqueo de ICPs (123). Esta conclusión se apoya además en los resultados en ensayos clínicos que asocian positivamente la presencia de TILs CD8⁺ CD103⁺, las cuales se expanden significativamente

al bloqueo de PD-1 (116).

En el área de inmunoterapia en cáncer existe un gran interés en mejorar el control del crecimiento tumoral, por lo que ha habido una ardua búsqueda de moléculas en linfocitos T que correlacionen con un incremento en su función efectora y como esta puede ser potenciada con diferentes estrategias de inmunoterapia. Interesantemente, en estudios de transcriptómica se han identificado en el infiltrado del tumor linfocitos T CD8⁺ que co-expresan marcadores de memoria, función efectora, troncalidad y fenotipo exhausto, revelando la complejidad ontogénica de los TILs. En el primer estudio llevado a cabo en pacientes con melanoma se definieron 6 subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺, observándose que en los pacientes que respondieron a la inmunoterapia anti-PD-1 se encontró enriquecida una subpoblación que expresa el marcador TCF-7, mientras que los pacientes que no respondieron a la inmunoterapia tenían enriquecida la subpoblación que expresa TIM-3⁺ (132). Hoy en día, que ya se conoce más de los subtipos de fenotipo exhausto de los linfocitos T, los estudios transcriptómicos han sido más enfocados a estos fenotipos, determinándose subpoblaciones exhaustas de transición entre los fenotipos de memoria y exhaustos (136,137).

En los resultados de este trabajo se observó que las Porinas inducen linfocitos T TIM-3⁺ CD8⁺ productores de IFN- γ y GZMB en el estroma tumoral. Se observó que los linfocitos que co-expresaban TIM-3 y PD-1, marcadores del fenotipo terminalmente exhausto, también tenían un fenotipo de memoria residente de tejido. Esta población de linfocitos Trm terminalmente exhaustos ha sido reportado previamente (98,109). En este trabajo esta población solamente se pudo apreciar cuando las Porinas fueron administradas en conjunto

a una fuente de antígeno, a diferencia de la estrategia con las Porinas solas. Considerando que la fuente de antígeno en la inmunización con las Porinas solas debió ser el propio melanoma con el que se retó y la inmunización completa comprendía de una fuente de antígeno exógena, la expresión de TIM-3 en los linfocitos Trm inducidos por las Porinas solas podría estar retrasada. Para demostrar lo anterior faltaría evaluar la respuesta Trm en el estroma tumoral inducida por las Porinas solas a tiempos más tardíos. Cabe mencionar que considerando que ambas estrategias, MAA + Porinas y las Porinas solas, inducen una respuesta Trm eficiente contra el melanoma en los experimentos presentados en este trabajo, el control tumoral no fue dependiente del fenotipo terminalmente exhausto de los linfocitos Trm.

De esta manera, al observar que la expresión de TIM-3 en linfocitos Trm inducidos por las Porinas no fue determinante para el control tumoral, se evaluó la dependencia del fenotipo progenitor exhausto. Inesperadamente, las Porinas inducen TILs que co-expresan TCF-1 y PD-1 (fenotipo progenitor exhausto), los cuales provienen de linfocitos T CD8⁺ de memoria residente de tejido. La presencia de esta población de linfocitos CD8⁺ Trm con un fenotipo de progenitor exhausto en el tumor correlacionó con un mejor control tumoral, demostrando su papel potencial en la respuesta anti-tumoral. Previamente se habían reportado linfocitos CD8⁺ Trm que expresan TIM-3 (98,109), sin embargo no existe ningún reporte de que los linfocitos Trm expresaran TCF-1. Recientemente se demostró que el marcador CD69 ayuda a determinar 4 subtipos de linfocitos exhaustos: dos subpoblaciones TCF-1⁺, tipo-efector y terminalmente exhausto. Una de las subpoblaciones de TCF-1⁺ expresa también CD69 (137), marcador que fue utilizado en este trabajo para determinar a linfocitos Trm. Aunque en el estudio reportado en la literatura el marcador CD103 no fue

determinante en la evaluación transcriptómica, probablemente por ser este marcado tejido-específico ligando de E-cadherina. La inmunización con las Porinas induce linfocitos CD8⁺ Trm con fenotipo de progenitor exhausto. Esta observación considera que el fenotipo de memoria residente de tejido puede co-existir con el fenotipo progenitor exhausto, lo cual es distinto a lo reportado previamente (139). Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis reportan la primera evidencia de linfocitos CD8⁺ Trm progenitor exhaustos inducidos por una inmunización. Sin embargo, considerando las diferencias con otros trabajos sería de gran relevancia en el futuro extender los resultados obtenidos en este trabajo para poder identificar categóricamente poblaciones de memoria residente de tejido con fenotipo exhausto y su contribución en el control tumoral. Es importante destacar que las evidencias presentadas en este y otros trabajos indican la complejidad de estas poblaciones, así como también la importancia de combinar herramientas “ómicas” y de datos masivos con estrategias experimentales para identificar a las poblaciones celulares presentes en el estroma tumoral, así como su relación con el control tumoral.

Relacionado con el hallazgo de la inducción de linfocitos Trm con fenotipo de progenitor exhausto, se ha reportado que los linfocitos CD8⁺ Trm infiltrantes de mucosas inducidos por infecciones virales expresan Blimp-1 (148,149), factor de transcripción que inhibe el gen *Tcf7*, la cual codifica para la proteína TCF-1. Esto puede estar relacionado con que un modelo de infección viral y de inmunización en tumor son altamente diferentes. También se ha documentado la capacidad de Blimp-1 en promover linfocitos T terminalmente exhaustos (136,150). Por el contrario, Blimp-1 también ha sido asociado a troncalidad, ya que es determinante en linaje en células madres hematopoyéticas, en células inmunes más maduras y en la respuesta eficiente de linfocitos T de memoria (148,151,152).

Además, se ha demostrado que Blimp-1 promueve la transcripción del gen *GZMB*, la cual codifica para la granzima B (149), molécula que es determinante tanto en el fenotipo Trm como en el fenotipo terminalmente exhausto. Estos reportes no excluyen la posibilidad de la co-existencia de Blimp-1 y TCF-1. Además, los estudios mencionados no evaluaron la expresión proteica de TCF-1, solamente evalúan la presencia del RNA mensajero, por lo que sería importante en el futuro evaluar la expresión de Blimp-1 en los linfocitos Trm con fenotipo de progenitor exhausto inducido por las Porinas. Por último, los linfocitos CD8⁺ Trm que expresan TCF-1 inducidos por las Porinas responden al bloqueo de PD-1, función que se ha observado tanto en el fenotipo progenitor exhausto TCF-1⁺ como en la respuesta Trm (85,98,125), por lo que se podría hipotetizar que la cooperación observada ante la inmunoterapia anti-PD-1 de los linfocitos Trm es dependiente de la expresión de TCF-1. Considerando lo encontrado en este trabajo, sería importante utilizar más marcadores para definir de mejor manera los linfocitos T CD8⁺ inducidos por las Porinas en el tumor, como Blimp-1 y TCF-1 para el fenotipo Trm (148,149,152,153) y Slamf6 para el fenotipo progenitor exhausto (127), o evaluar la firma transcriptómica y compararla con la respuesta que se induce de otros adyuvantes. Recientemente se reportó que la expresión de TCF-1 inducida por TGF- β inhibe la expresión proteica de CD103 en linfocitos Trm en pulmón en una infección viral (154), sin embargo los distintos fenotipos podrían variar de acuerdo a las condiciones de inmunización.

Se han reportado diferentes adyuvantes capaces de inducir una respuesta anti-tumoral efectiva, pero a pocas de estas estrategias de inmunización se les ha determinado una cooperación con el bloqueo de PD-1 (26-28,32). Cabe mencionar que solamente existe un

previo reporte que se evalúa la inducción de linfocitos T progenitor exhaustos por medio de una inmunización con poly I:C como adyuvante, para así explicar la sinergia con la inmunoterapia anti-PD-1/CTLA-4 (139), sin embargo para observar esta respuesta fue necesaria una transferencia adoptiva. En los experimentos realizados en el presente trabajo, las Porinas fueron capaces de inducir la formación de linfocitos TCF-1⁺ PD-1⁺ CD8⁺ Trm en un modelo con repertorio endógeno en una estrategia terapéutica, por lo que se les evaluó la respuesta ante el bloqueo de PD-1. Se observó una respuesta anti-tumoral eficiente, aun cuando la inmunoterapia anti-PD-1 se ejecutó a tiempos más tardíos comparado con modelos de otros reportes de melanoma en ratón, ya que el tumor tenía un tamaño considerable al momento de la administración de mAb anti-PD-1. Importantemente, la inmunización con CTB no fue capaz de inducir linfocitos T CD8⁺ con el fenotipo progenitor exhausto, ni tampoco de cooperar con la inmunoterapia anti-PD-1, sugiriendo fuertemente que la respuesta al bloqueo de PD-1 proviene de linfocitos TCF-1⁺ PD-1⁺ CD8⁺ Trm, observados solamente con las Porinas. Este hallazgo concuerda con que un infiltrado tumoral de células TCF-7⁺ PD-1⁺ CD8⁺ en pacientes de melanoma correlaciona con la respuesta a la inmunoterapia anti-PD-1 (127,132), relación observada también en pacientes con cáncer de riñón (135). Los datos de este trabajo también concuerdan con previos reportes que demuestran que el bloqueo de PD-1 expande la población de linfocitos TCF-1⁺ PD-1⁺ CD8⁺ en ratón (127). De acuerdo con estos resultados, se observó que los linfocitos TCF-1⁺ CD103⁺ CD8⁺ inducidos por las Porinas se expanden ante la inmunoterapia anti-PD-1. El estudio de Miller B.C. también observa una expansión de la respuesta terminalmente exhausta ante el bloqueo de PD-1, posiblemente por la diferenciación exacerbada de los linfocitos progenitores exhaustos (127). En contraste, en los resultados de este trabajo no se apreciaron cambios en linfocitos TIM-3⁺ PD-1⁺ ante la inmunoterapia anti-PD-1. El resultado

obtenido en este trabajo de que las Porinas pueden inducir una respuesta inmune con un fenotipo progenitor exhausto que es capaz de responder al subsecuente bloqueo de PD-1, es de gran relevancia para el diseño de potenciales tratamientos en pacientes. Este potencial tratamiento podría aplicarse como una estrategia neoadyuvante, que podría traer beneficios en la prognosis de la inmunoterapia anti-PD-1, en especial en pacientes que no tengan una respuesta inmune natural contra el melanoma.

Hoy en día la gran mayoría de los ensayos clínicos que tratan inmunoterapias para melanoma, están enfocados en mejorar el desarrollo de las terapias con más éxito, específicamente los ICPs (PD-1, CTLA-4 y PD-L1) y terapias dirigidas, las cuales consisten en inhibir farmacológicamente a proteínas mutadas específicas del cáncer (BRAF, MEK). Estas terapias están aprobadas por la FDA, ya como monoterapias o en combinación (155). Aunque hay mucha información al respecto, habiendo ensayos dedicados a entender los efectos en los pacientes al respecto de la dosis, duración, combinación y orden de los tratamientos, así como también sobre marcadores de pronóstico, toxicidad, resistencia primaria y adquirida, no hay un consenso definido de cual es el diseño de la inmunoterapia óptima, lo más cercano es el algoritmo a seguir por la Society for Immunotherapy of Cancer (10). Este algoritmo todavía no propone utilizar inmunoterapias en estadios del melanoma temprano, entendible ya que la mayoría de la información de estos tratamientos fueron descubiertos en estadios tardíos, dejando de lado tratamientos neoadyuvantes. Recientemente se ha observado que tratamientos neoadyuvantes pueden tener un beneficio al compararse con terapias adyuvantes, en específico en un estudio en que el 97% de los pacientes que tuvieron una respuesta completa o casi completa a la inmunoterapia anti-PD-1/CTLA-4 no se les llevó a cabo la disección de ganglios drenantes del tumor (156). Además de evitar problemas

relacionados a la cirugía, es probable que haya un beneficio en tener intactos los ganglios drenantes, ya que aunque ya hayan sufrido metastasis, el mecanismo anti-tumoral del sistema inmune adaptativo podría seguir siendo importante. Se sigue estudiando la mejor forma de estrategias terapéuticas con una estrategia adyuvante (157,158), pero es crucial que se compare con las estrategias neoadyuvantes, las cuales prometen tener muchos beneficios (159). Una de los beneficios de la estrategia neoadyuvante sería la utilización de inmunizaciones previas al uso de bloquear ICPs, ya que se podría inducir una respuesta inmune que responda a esta inmunoterapia. Se están llevando a cabo ensayos clínicos que ponen a prueba esta estrategia, en uno de estos ensayos se inyecta intratumoralmente un RNA agonistas de TLR7/8 como monoterapia o en combinación con mAb anti-PD-1 (NCT03291002), en otro ensayo clínico se inyecta subcutáneamente o intratumoralmente un DNA antagonista de TLR-9 como monoterapia (NCT04126876) o en combinación con inhibidores de ICPs (NCT03445533, NCT04401995, NCT03618641). Uno de los adyuvantes de inmunizaciones con mayor expectativa es el estimulador de genes de interferon (STING) por los resultados que se observaron en ratón (160), sin embargo, esto no se logró emular en ensayos clínicos (161). Posteriormente se descubrió que el mecanismo por el cual se activaba STING en ratón no era posible activar la molécula STING de humano (161), por lo que se reformuló la molécula y ya se está poniendo a prueba (NCT04144140) (162). El entendimiento de los mecanismos de acción de los adyuvantes en ratón es crucial para poder extrapolarse a humano. A pesar de que las Porinas están autorizadas para su uso en humano (42), no han sido evaluadas en el contexto de cáncer. De esta manera los resultados obtenidos en este trabajo de tesis aportan datos importantes para el potencial uso de este adyuvante en humanos. Otro punto importante sería determinar la fuente de antígenos, ya que la mayoría de los resultados de este trabajo se basan en el antígeno modelo OVA y en antígenos

asociados a tumor como los péptidos de tirosinasa y gp100. Actualmente se utilizan diferentes estrategias de fuentes de antígeno, recientemente se puede mencionar la vacuna terapéutica polivalente seviprotimut-L, que deriva de tres líneas de melanoma humano (163) y el RNA liposomal que codifica a cuatro MAAs (MAGE-A3, NY-ESO-1, tirosinasa, TPTE) (164). Considerando que todavía no hay un *cancer vaccine* ni una estrategia neoadyuvante para tratar el melanoma, y teniendo en cuenta que las Porinas son capaces de poder inducir una respuesta inmune, tanto en ratón como en humano, la utilización de las Porinas en ensayos clínicos podría ser de alta relevancia en el ámbito de la oncoinmunología contra melanoma.

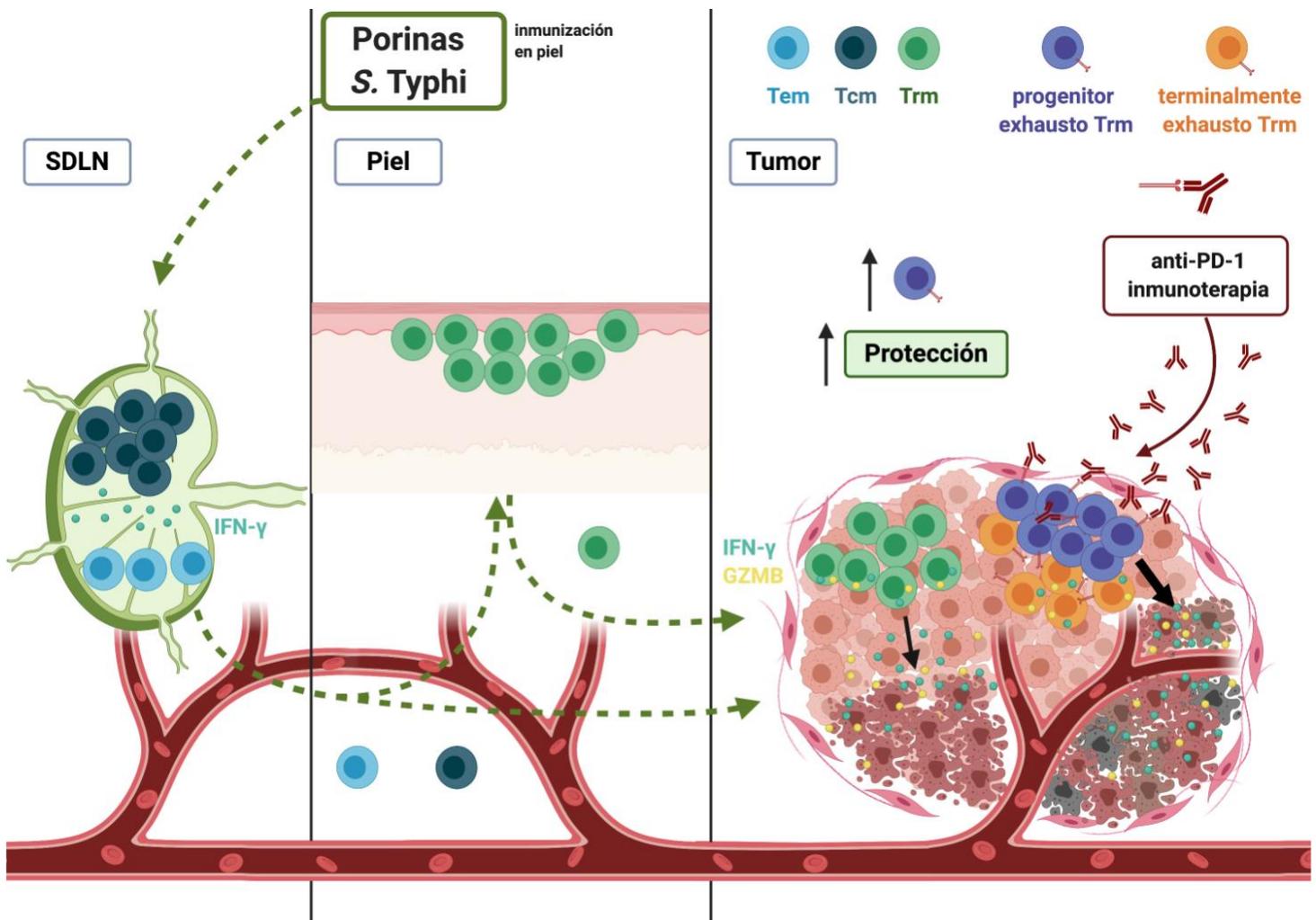


Figura 20. Modelo de protección contra el melanoma con la estrategia de inmunización utilizando a las Porinas de *Salmonella Typhi*. En la figura esta representado la respuesta circulante de los nódulos linfáticos drenantes de piel (SDLN) y la respuesta Trm en piel y tumor inducida por la inmunización con las Porinas. Las Porinas como adyuvante inducen linfocitos T de memoria circulante, así también linfocitos Trm en piel y linfocitos Trm funcionales en el tumor. La inmunización con las Porinas es capaz de inducir linfocitos infiltrantes de tumor TIM-3⁺ PD-1⁺ CD8⁺ Trm (terminalmente exhaustos Trm) e importantemente linfocitos TCF-1⁺ PD-1⁺ CD8⁺ Trm (progenitor exhausto Trm), siendo el último asociado al control del crecimiento tumoral y la cooperación a la inmunoterapia anti-PD-1.

En conjunto, los hallazgos de este trabajo de tesis resaltan la importancia de inducir eficazmente una respuesta temprana de linfocitos Trm en el estroma tumoral, que además tengan un fenotipo progenitor exhausto para que sean capaces de controlar el crecimiento

tumoral de forma independiente o en cooperación con la inmunoterapia anti-PD-1. Como perspectiva, sería de gran relevancia poder comprender a fondo como es posible inducir esta respuesta con diferentes estrategias de *cancer vaccines*. También es necesario entender como es la modulación en los linfocitos CD8⁺ Trm progenitor exhaustos ante el bloqueo de PD-1, ya sea en fenotipo, función y diferenciación. Es crucial una mayor comprensión de estos mecanismos, particularmente por la cantidad de pacientes con melanoma que no responden a la inmunoterapia o terminan recayendo (35). Nuestros resultados podrían tener relevancia en melanoma pero podrían extenderse a otros tipos de cáncer, ya que tanto la respuesta de Trm como la presencia de el fenotipo progenitor exhausto han sido identificados en otros tumores diferentes a melanoma (135,136).

CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que las Porinas de *Salmonella Typhi* son un adyuvante eficiente tipo PAMP para antígenos tumorales naturales o antígenos modelo, en las estrategias de inmunización terapéutica y profiláctica contra el crecimiento tumoral de melanoma en ratón. Las Porinas son capaces de inducir linfocitos T productores de IFN- γ , T_{cm} y T_{em} en ganglios; así también importantemente una respuesta Trm temprana con baja expresión de PD-1 en piel. En el tumor, las Porinas son capaces de inducir linfocitos T TIM-3⁺ CD8⁺ productoras de IFN- γ y GZMB, y linfocitos T CD8⁺ que co-expresan TCF-1 y PD-1, marcadores del fenotipo progenitor exhausto, los cuales provienen de linfocitos T CD8⁺ de memoria residente de tejido. Esta población de linfocitos CD8⁺ Trm con un fenotipo progenitor exhausto correlaciona con una respuesta anti-tumoral eficiente, la cual se

incrementa al cooperar con la inmunoterapia anti-PD-1 (**Fig. 20**). A diferencia de las Porinas, la CTB fue incapaz de inducir esta respuesta ni responder al bloqueo de PD-1. En resumen, los datos evidencian la importancia de la elección correcta de adyuvantes en el desarrollo de *cancer vaccines*, para así promover una apropiada respuesta anti-tumoral en el tumor, colocando a las Porinas como una adyuvante potencial. La combinación de inmunizaciones e inmunoterapias ICP podrían dar nuevas opciones de tratamientos para pacientes con tumores agresivos, en especial en los pacientes que tienen un tumor en donde no se aprecia una respuesta inmune natural.

BIBLIOGRAFÍA

1. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nature Publishing Group* (2016) **16**:345–358. doi:10.1038/nrc.2016.37
2. ACS. Cancer Facts & Figures. *Atlanta American Cancer Society* (2020)1–76.
3. Melanoma of the Skin - Cancer Stat Facts. Melanoma of the Skin - Cancer Stat Facts. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html> Available at: seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html [Accessed January 12, 2018]
4. Secretaría de Salud. Abordaje Diagnóstico de Melanoma Maligno. (2010)1–52.
5. Yost KE, Satpathy AT, Wells DK, Qi Y, Wang C, Kageyama R, McNamara KL, Granja JM, Sarin KY, Brown RA, et al. Clonal replacement of tumor-specific T cells following PD-1 blockade. *Nature Medicine* (2019) **25**:1251–1259. doi:10.1038/s41591-019-0522-3
6. Lino-Silva LS, Domínguez-Rodríguez JA, Aguilar-Romero JM, Martínez-Said H, Salcedo-Hernández RA, García-Pérez L, Herrera-Gómez Á, Cuellar-Hubbe M. Melanoma in Mexico: Clinicopathologic Features in a Population with Predominance of Acral Lentiginous Subtype. *Ann Surg Oncol* (2016) **23**:4189–4194. doi:10.1245/s10434-016-5394-x
7. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. (2011) **144**:1–29. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
8. Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, Wolf D, Bortone DS, Yang T-HO, Porta-Pardo E, Gao GF, Plaisier CL, Eddy JA, et al. The Immune Landscape of Cancer. *Immunity* (2018) **48**:812–830.e14. doi:10.1016/j.immuni.2018.03.023
9. Roufas C, Chasiotis D, Makris A, Efstathiades C, Dimopoulos C, Zaravinos A. The Expression and Prognostic Impact of Immune Cytolytic Activity-Related Markers in Human Malignancies: A Comprehensive Meta-analysis. *Front Oncol* (2018) **8**:233–18. doi:10.3389/fonc.2018.00027
10. Sullivan RJ, Atkins MB, Kirkwood JM, Agarwala SS, Clark JI, Ernstoff MS, Fecher L, Gajewski TF, Gastman B, Lawson DH, et al. An update on the Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on tumor immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma: version 2.0. *Journal for Immunotherapy of Cancer* (2018) **6**:1–23. doi:10.1186/s40425-018-0362-6
11. Kewitz S, Stiefel M, Kramm CM, Staeger MS. Impact of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation and MGMT expression on dacarbazine resistance of Hodgkin's lymphoma cells. *Leukemia Research* (2014) **38**:138–143. doi:10.1016/j.leukres.2013.11.001

12. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, Lebbé C, Baurain J-F, Testori A, Grob JJ, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* (2011) **364**:2517–2526. doi:10.1056/NEJMoa1104621
13. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, Hassel JC, Rutkowski P, McNeil C, Kalinka-Warzocha E, et al. Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation. *N Engl J Med* (2015) **372**:320–330. doi:10.1056/NEJMoa1412082
14. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Lao CD, Cowey CL, Schadendorf D, Wagstaff J, Dummer R, et al. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* (2019) **381**:1535–1546. doi:10.1056/NEJMoa1910836
15. Wolchok JD. How is Immunotherapy for Melanoma Changing the Outlook for Patients? cancerresearch.org/immunotherapy/cancer-types/cancer-vaccines
16. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways. *American Journal of Clinical Oncology* (2016) **39**:98–106. doi:10.1097/COC.0000000000000239
17. Ogando J, Sáez ME, Santos J, Nuevo-Tapióles C, Gut M, Esteve-Codina A, Heath S, González-Pérez A, Cuezva JM, Lacalle RA, et al. PD-1 signaling affects cristae morphology and leads to mitochondrial dysfunction in human CD8⁺ T lymphocytes. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* (2019) **7**:1–17. doi:10.1186/s40425-019-0628-7
18. Tagliamonte M, Petrizzo A, Tornesello ML, Buonaguro FM, Buonaguro L. Antigen-specific vaccines for cancer treatment. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* (2014) **10**:3332–3346. doi:10.4161/21645515.2014.973317
19. Lizee G, Overwijk WW, Radvanyi L, Gao J, Sharma P, Hwu P. Harnessing the Power of the Immune System to Target Cancer. (2013) **64**:71–90. doi:10.1146/annurev-med-112311-083918
20. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* (1998) **392**:245–252. doi:10.1038/32588
21. Huen AO, Rook AH. Toll receptor agonist therapy of skin cancer and cutaneous T-cell lymphoma. *Current Opinion in Oncology* (2014) **26**:237–244. doi:10.1097/CCO.0000000000000048
22. Lu H. TLR agonists for cancer immunotherapy: tipping the balance between the immune stimulatory and inhibitory effects. (2014)1–4. doi:10.3389/fimmu.2014.00083/abstract

23. Butterfield LH. Cancer vaccines. *BMJ* (2015) **350**:h988–h988. doi:10.1136/bmj.h988
24. Sultan H, Fesenkova VI, Addis D, Fan AE, Kumai T, Wu J, Salazar AM, Celis E. Designing therapeutic cancer vaccines by mimicking viral infections. *Cancer Immunol Immunother* (2016) **66**:203–213. doi:10.1007/s00262-016-1834-5
25. Dowling JK, Mansell A. Toll-like receptors: the swiss army knife of immunity and vaccine development. (2016) **5**:e85–10. doi:10.1038/cti.2016.22
26. Salmon H, Idoyaga J, Rahman A, Leboeuf M, Remark R, Jordan S, Casanova-Acebes M, Khudoynazarova M, Agudo J, Tung N, et al. Expansion and Activation of CD103+ Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity* (2016) **44**:924–938. doi:10.1016/j.immuni.2016.03.012
27. Takeda Y, Kataoka K, Yamagishi J, Ogawa S, Seya T, Matsumoto M. A TLR3-Specific Adjuvant Relieves Innate Resistance to PD-L1 Blockade without Cytokine Toxicity in Tumor Vaccine Immunotherapy. *CellReports* (2017) **19**:1874–1887. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.015
28. Wang S, Campos J, Gallotta M, Gong M, Crain C, Naik E, Coffman RL, Guiducci C. Intratumoral injection of a CpG oligonucleotide reverts resistance to PD-1 blockade by expanding multifunctional CD8 +T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2016) **113**:E7240–E7249. doi:10.1073/pnas.1608555113
29. Perret R, Sierro SR, Botelho NK, Corgnac S, Donda A, Romero P. Adjuvants That Improve the Ratio of Antigen-Specific Effector to Regulatory T Cells Enhance Tumor Immunity. *Cancer Research* (2013) **73**:6597–6608. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0875
30. Hailemichael Y, Overwijk WW. Cancer vaccines: Trafficking of tumor-specific T cells to tumor after therapeutic vaccination. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (2014) **53**:46–50. doi:10.1016/j.biocel.2014.04.019
31. Makkouk A, Weiner GJ. Cancer Immunotherapy and Breaking Immune Tolerance: New Approaches to an Old Challenge. *Cancer Research* (2015) **75**:5–10. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2538
32. Wang H, Hu S, Chen X, Shi H, Chen C, Sun L, Chen ZJ. cGAS is essential for the antitumor effect of immune checkpoint blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2017) **114**:1637–1642. doi:10.1073/pnas.1621363114

33. Redelman-Sidi G, Glickman MS, Bochner BH. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer—a current perspective. *Nature Reviews Urology* (2014) **11**:153–162.
34. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, Redfern CH, Ferrari AC, Dreicer R, Sims RB, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* (2010) **363**:411–422. doi:10.1056/NEJMoa1001294
35. León-Letelier RA, Bonifaz LC, Fuentes-Pananá EM. OMIC signatures to understand cancer immunosurveillance and immunoediting: Melanoma and immune cells interplay in immunotherapy. *Journal of Leukocyte Biology* (2019) **161**:1. doi:10.1002/JLB.MR0618-241RR
36. Carson WE, Unger JM, Sosman JA, Flaherty LE, Tuthill RJ, Porter MJ, Thompson JA, Kempf RA, Othus M, Ribas A, et al. Adjuvant vaccine immunotherapy of resected, clinically node-negative melanoma: long-term outcome and impact of HLA class I antigen expression on overall survival. *Cancer Immunology Research* (2014) **2**:981–987. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0052
37. Reyes D, Salazar L, Espinoza E, Pereda C, n ECO, Valdevenito R, Huidobro C, Becker MIES, Lladser A, pez MNLO, et al. Tumour cell lysate-loaded dendritic cell vaccine induces biochemical and memory immune response in castration-resistant prostate cancer patients. *Br J Cancer* (2013) **109**:1488–1497. doi:10.1038/bjc.2013.494
38. Salazar-Onfray F, Pereda C, Reyes D, López MN. TAPCells, the Chilean dendritic cell vaccine against melanoma and prostate cancer. *Biol Res* (2013) **46**:431–440. doi:10.4067/S0716-97602013000400014
39. González FE, Ortiz C, Reyes M, Dutzan N, Patel V, Pereda C, Gleisner MA, López MN, Gutkind JS, Salazar-Onfray F. Melanoma cell lysate induces CCR7 expression and in vivomigration to draining lymph nodes of therapeutic human dendritic cells. *Immunology* (2014) **142**:396–405. doi:10.1111/imm.12264
40. Obeid J, Hu Y, Slingluff CL. Vaccines, Adjuvants, and Dendritic Cell Activators—Current Status and Future Challenges. *Seminars in Oncology* (2015) **42**:549–561. doi:10.1053/j.seminoncol.2015.05.006
41. Moreno-Eutimio MA, Tenorio-Calvo A, Pastelin-Palacios R, Perez-Shibayama C, Gil-Cruz C, López-Santiago R, Baeza I, Fernández-Mora M, Bonifaz L, Isibasi A, et al. SalmonellaTyphi OmpS1 and OmpS2 porins are potent protective immunogens with adjuvant properties. *Immunology* (2013) **139**:459–471. doi:10.1111/imm.12093

42. Salazar-González RM, Maldonado-Bernal C, Ramírez-Cruz NE, Rios-Sarabia N, Beltrán-Nava J, Castañón-González J, Castillo-Torres N, Palma-Aguirre JA, Carrera-Camargo M, López-Macías C, et al. Induction of cellular immune response and anti-Salmonella enterica serovar typhi bactericidal antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever. *Immunology Letters* (2004) **93**:115–122. doi:10.1016/j.imlet.2004.01.010
43. Cervantes-Barragán L, Gil-Cruz C, Pastelin-Palacios R, Lang KS, Isibasi A, Ludewig B, López-Macías C. TLR2 and TLR4 signaling shapes specific antibody responses to Salmonella typhi antigens. *Eur J Immunol* (2009) **39**:126–135. doi:10.1002/eji.200838185
44. Diaz-Quinonez A, Martin-Orozco N, Isibasi A, Ortiz-Navarrete V. Two Salmonella OmpC Kb-Restricted Epitopes for CD8⁺-T-Cell Recognition. *Infection and Immunity* (2004) **72**:3059–3062. doi:10.1128/IAI.72.5.3059-3062.2004
45. Perez-Shibayama C, Gil-Cruz C, Pastelin-Palacios R, Cervantes-Barragán L, Hisaki E, Chai Q, Onder L, Scandella E, Regen T, Waisman A, et al. IFN- γ -Producing CD4⁺T Cells Promote Generation of Protective Germinal Center-Derived IgM⁺B Cell Memory against Salmonella Typhi. *The Journal of Immunology* (2014) **192**:5192–5200. doi:10.4049/jimmunol.1302526
46. Pérez-Toledo M, Valero-Pacheco N, Pastelin-Palacios R, Gil-Cruz C, Perez-Shibayama C, Moreno-Eutimio MA, Becker I, Pérez-Tapia SM, Arriaga-Pizano L, Cunningham AF, et al. Salmonella Typhi Porins OmpC and OmpF Are Potent Adjuvants for T-Dependent and T-Independent Antigens. *Front Immunol* (2017) **8**:323–10. doi:10.3389/fimmu.2017.00230
47. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* (2001)1–5.
48. Muranski P, Restifo NP. Does IL-17 promote tumor growth? *Blood* (2009) **114**:231–232. doi:10.1182/blood-2009-04-215541
49. Muranski P, Restifo NP. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* (2013) **121**:2402–2414. doi:10.1182/blood-2012-09-378653
50. Sim GC, Radvanyi L. The IL-2 cytokine family in cancer immunotherapy. *Cytokine and Growth Factor Reviews* (2014) **25**:377–390. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.07.018
51. Basset C, Thiam F, Di Martino C, Holton J, Clements JD, Kohli E. Cholera-Like Enterotoxins and Regulatory T cells. *Toxins* (2010) **2**:1774–1795. doi:10.3390/toxins2071774

52. Holmgren J, Svennerholm AM, Jertborn M, Clemens J, Sack DA, Salenstedt R, Wigzell H. An oral B subunit: whole cell vaccine against cholera. *Vaccine* (1992) **10**:911–914. doi:10.1016/0264-410x(92)90324-d
53. World Health Organization. Cholera vaccines: WHO position paper – August 2017. *Wkly Epidemiol Rec* (2017) **92**:477–498.
54. Hou J, Liu Y, Hsi J, Wang H, Tao R, Shao Y. Cholera toxin B subunit acts as a potent systemic adjuvant for HIV-1 DNA vaccination intramuscularly in mice. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* (2014) **10**:1274–1283. doi:10.4161/hv.28371
55. Orimo T, Sasaki I, Hemmi H, Ozasa T, Fukuda-Ohta Y, Ohta T, Morinaka M, Kitauchi M, Yamaguchi T, Sato Y, et al. Cholera toxin B induces interleukin-1 β production from resident peritoneal macrophages through the pyrin inflammasome as well as the NLRP3 inflammasome. *International Immunology* (2019) **31**:657–668. doi:10.1093/intimm/dxz004
56. Phongsisay V, Iizasa E, Hara H, Yoshida H. Evidence for TLR4 and FcR γ -CARD9 activation by cholera toxin B subunit and its direct bindings to TREM2 and LMIR5 receptors. *Molecular Immunology* (2015) **66**:463–471. doi:10.1016/j.molimm.2015.05.008
57. Wiedinger K, Romlein H, Bitsaktsis C. Cholera toxin B induced activation of murine macrophages exposed to a fixed bacterial immunogen. *Ther Adv Vaccines* (2015) **3**:155–163. doi:10.1177/2051013615613473
58. Shreedhar VK, Kelsall BL, Neutra MR. Cholera toxin induces migration of dendritic cells from the subepithelial dome region to T- and B-cell areas of Peyer's patches. *Infection and Immunity* (2003) **71**:504–509. doi:10.1128/iai.71.1.504-509.2003
59. Anjuère F, George-Chandy A, Audant F, Rousseau D, Holmgren J, Czerkinsky C. Transcutaneous Immunization with Cholera Toxin B Subunit Adjuvant Suppresses IgE Antibody Responses Via Selective Induction of Th1 Immune Responses. *The Journal of Immunology* (2003) **170**:1586–1592. doi:10.4049/jimmunol.170.3.1586
60. Anosova NG, Chabot S, Shreedhar V, Borawski JA, Dickinson BL, Neutra MR. Cholera toxin, E. coli heat-labile toxin, and non-toxic derivatives induce dendritic cell migration into the follicle-associated epithelium of Peyer's patches. *Mucosal Immunol* (2007) **1**:59–67. doi:10.1038/mi.2007.7
61. Meza Sánchez D, Pérez Montesinos G, Sánchez García J, Moreno J, Bonifaz LC. Intradermal immunization in the ear with cholera toxin and its non-toxic β subunit promotes efficient Th1 and Th17 differentiation dependent on migrating DCs. *Eur J Immunol* (2011) **41**:2894–2904. doi:10.1002/eji.201040997

62. Li J, Arévalo MT, Chen Y, vaccines OPH, 2014. Intranasal immunization with influenza antigens conjugated with cholera toxin subunit B stimulates broad spectrum immunity against influenza viruses. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* (2014) doi:10.4161/hv.28400
63. Antonio-Herrera L, Badillo-Godinez O, Medina-Contreras O, Tepale-Segura A, García-Lozano A, Gutierrez-Xicotencatl L, Soldevila G, Esquivel-Guadarrama FR, Idoyaga J, Bonifaz LC. The Nontoxic Cholera B Subunit Is a Potent Adjuvant for Intradermal DC-Targeted Vaccination. *Front Immunol* (2018) **9**:12071–16. doi:10.3389/fimmu.2018.02212
64. Olivera N, Castuma CE, Hozbor D, Gaillard ME, Rumbo M, Gómez RM. Immunization with the Recombinant Cholera Toxin B Fused to Fimbria 2 Protein Protects against *Bordetella pertussis* Infection. *BioMed Research International* (2014) **2014**:1–11. doi:10.1155/2014/421486
65. Wiedinger K, Pinho D, Bitsaktsis C. Utilization of cholera toxin B as a mucosal adjuvant elicits antibody-mediated protection against *S. pneumoniae* infection in mice. *Ther Adv Vaccines* (2017) **5**:15–24. doi:10.1177/2051013617691041
66. Bitsaktsis C, Rawool DB, Li Y, Kurkure NV, Iglesias B, Gosselin EJ. Differential Requirements for Protection against Mucosal Challenge with *Francisella tularensis* in the Presence versus Absence of Cholera Toxin B and Inactivated *F. tularensis*. *The Journal of Immunology* (2009) **182**:4899–4909. doi:10.4049/jimmunol.0803242
67. Nakajima C, Uekusa Y, Iwasaki M, Yamaguchi N, Mukai T, Gao P, Tomura M, Ono S, Tsujimura T, Fujiwara H, et al. A role of interferon-gamma (IFN-gamma) in tumor immunity: T cells with the capacity to reject tumor cells are generated but fail to migrate to tumor sites in IFN-gamma-deficient mice. *Cancer Research* (2001) **61**:3399–3405.
68. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1998) **95**:7556–7561.
69. Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN γ receptors. *Immunity* (1994) **1**:447–456. doi:10.1016/1074-7613(94)90087-6
70. Viguier M, Lemaitre F, Verola O, Cho MS, Gorochov G, Dubertret L, Bachelez H, Kourilsky P, Ferradini L. Foxp3 Expressing CD4⁺CD25^{high} Regulatory T Cells Are Overrepresented in Human Metastatic Melanoma Lymph Nodes and Inhibit the Function of Infiltrating T Cells. *The Journal of Immunology* (2004) **173**:1444–1453. doi:10.4049/jimmunol.173.2.1444

71. Whiteside TL. FOXP3+ Treg as a therapeutic target for promoting anti-tumor immunity. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (2018) **0**:1–52. doi:10.1080/14728222.2018.1451514
72. Fluxá P, Rojas-Sepúlveda D, Gleisner MA, Tittarelli A, Villegas P, Tapia L, Rivera MT, López MN, Catán F, Uribe M, et al. High CD8+ and absence of Foxp3+ T lymphocytes infiltration in gallbladder tumors correlate with prolonged patients survival. *BMC Cancer* (2018) **18**:1–11. doi:10.1186/s12885-018-4147-6
73. Borst J, Ahrends T, Bąbała N, Melief CJM, Kastenmüller W. CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nature Publishing Group* (2018) **18**:1–13. doi:10.1038/s41577-018-0044-0
74. Ahrends T, Spanjaard A, Pilzecker B, Bąbała N, Bovens A, Xiao Y, Jacobs H, Borst J. CD4+ T Cell Help Confers a Cytotoxic T Cell Effector Program Including Coinhibitory Receptor Downregulation and Increased Tissue Invasiveness. *Immunity* (2017) **47**:1–20. doi:10.1016/j.immuni.2017.10.009
75. Mueller SN, Mackay LK. Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. *Nat Rev Immunol* (2016) **16**:1–11. doi:10.1038/nri.2015.3
76. Kumar BV, Ma W, Miron M, Granot T, Guyer RS, Carpenter DJ, Senda T, Sun X, Ho S-H, Lerner H, et al. Human Tissue-Resident Memory T Cells Are Defined by Core Transcriptional and Functional Signatures in Lymphoid and Mucosal Sites. *Cell Reports* (2017) **20**:2921–2934. doi:10.1016/j.celrep.2017.08.078
77. Mackay LK, Braun A, Macleod BL, Collins N, Tebartz C, Bedoui S, Carbone FR, Gebhardt T. Cutting edge: CD69 interference with sphingosine-1-phosphate receptor function regulates peripheral T cell retention. *J Immunol* (2015) **194**:2059–2063. doi:10.4049/jimmunol.1402256
78. Skon CN, Lee J-Y, Anderson KG, Masopust D, Hogquist KA, Jameson SC. Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8+ T cells. *Nat Immunol* (2013)1–11. doi:10.1038/ni.2745
79. Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. *Molecular Pathology* (1999) **52**:189–196. doi:10.1136/mp.52.4.189
80. Mackay LK, Rahimpour A, Ma JZ, Collins N, Stock AT, Hafon M-L, Vega-Ramos J, Lauzurica P, Mueller SN, Stefanovic T, et al. The developmental pathway for CD103+CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat Immunol* (2013) **14**:1–10. doi:10.1038/ni.2744
81. Fonseca R, Beura LK, Quarnstrom CF, Ghoneim HE, Fan Y, Zebley CC, Scott MC, Fares-Frederickson NJ, Wijeyesinghe S, Thompson EA, et al. Developmental plasticity allows outside-in immune responses by resident

- memory T cells. *Nat Immunol* (2020) **21**:1–12. doi:10.1038/s41590-020-0607-7
82. Gratz IK, Campbell DJ. Resident memory T cells show that it is never too late to change your ways. *Nat Immunol* (2020) **21**:1–2. doi:10.1038/s41590-020-0637-1
83. Milner JJ, Toma C, Yu B, Zhang K, Omilusik K, Phan AT, Wang D, Getzler AJ, Nguyen T, Crotty S, et al. Runx3 programs CD8⁺ T cell residency in non-lymphoid tissues and tumours. *Nature* (2018)1–24. doi:10.1038/nature24993
84. Sheridan BS, Pham Q-M, Lee Y-T, Cauley LS, Puddington L, Lefrançois L. Oral Infection Drives a Distinct Population of Intestinal Resident Memory CD8⁺ T Cells with Enhanced Protective Function. *Immunity* (2014) **40**:747–757. doi:10.1016/j.immuni.2014.03.007
85. Enamorado M, Iborra S, Priego E, Cueto FJ, Quintana JA, nez-Cano SMI, rez EMIA-PE, Esteban M, Melero I, Hidalgo AES, et al. Enhanced anti-tumour immunity requires the interplay between resident and circulating memory CD8⁺ T cells. *Nature Communications* (2017) **8**:1–11. doi:10.1038/ncomms16073
86. Graef P, Buchholz VR, Stemberger C, Flossdorf M, Henkel L, Schiemann M, Drexler I, Höfer T, Riddell SR, Busch DH. Serial Transfer of Single-Cell-Derived Immunocompetence Reveals Stemness of CD8⁺ Central Memory T Cells. *Immunity* (2014) **41**:116–126. doi:10.1016/j.immuni.2014.05.018
87. Iborra S, Martínez-López M, Khouili SC, Enamorado M, Cueto FJ, Conde-Garrosa R, del Fresno C, Sancho D. Optimal Generation of Tissue-Resident but Not Circulating Memory T Cells during Viral Infection Requires Crosspriming by DNGR-1⁺ Dendritic Cells. *Immunity* (2016) **45**:1–15. doi:10.1016/j.immuni.2016.08.019
88. Wu T-C, Xu K, Banchereau R, Marches F, Yu CI, Martinek J, Anguiano E, Pedroza-Gonzalez A, Snipes GJ, O'Shaughnessy J, et al. Reprogramming tumor-infiltrating dendritic cells for CD103⁺ CD8⁺ mucosal T-cell differentiation and breast cancer rejection. *Cancer Immunology Research* (2014) **2**:487–500. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0217
89. Iijima N, Iwasaki A. T cell memory. A local macrophage chemokine network sustains protective tissue-resident memory CD4 T cells. *Science* (2014) **346**:93–98. doi:10.1126/science.1257530
90. Nakanishi Y, Lu B, Gerard C, Iwasaki A. CD8⁺ T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4⁺ T-cell help. *Nature* (2009)1–5. doi:10.1038/nature08511

91. Gebhardt T, Wakim LM, Eidsmo L, Reading PC, Heath WR, Carbone FR. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat Immunol* (2009) **10**:524–530. doi:10.1038/ni.1718
92. Masopust D, Vezys V, Wherry EJ, Barber DL, Ahmed R. Cutting Edge: Gut Microenvironment Promotes Differentiation of a Unique Memory CD8 T Cell Population. *The Journal of Immunology* (2006) **176**:2079–2083. doi:10.4049/jimmunol.176.4.2079
93. Casey KA, Fraser KA, Schenkel JM, Moran A, Abt MC, Beura LK, Lucas PJ, Artis D, Wherry EJ, Hogquist K, et al. Antigen-independent differentiation and maintenance of effector-like resident memory T cells in tissues. *J Immunol* (2012) **188**:4866–4875. doi:10.4049/jimmunol.1200402
94. Zhang N, Bevan MJ. Transforming Growth Factor- β ; Signaling Controls the Formation and Maintenance of Gut-Resident Memory T Cells by Regulating Migration and Retention. *Immunity* (2013) **39**:687–696. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.019
95. Wu T-C, Xu K, Banchereau R, Marches F, Yu CI, Martinek J, Anguiano E, Pedroza-Gonzalez A, Snipes GJ, O'Shaughnessy J, et al. Reprogramming tumor-infiltrating dendritic cells for CD103⁺ CD8⁺ mucosal T-cell differentiation and breast cancer rejection. *Cancer Immunology Research* (2014) **2**:487–500. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0217
96. Amsen D, Gisbergen KPJM, Hombriak P, Lier RAW. Tissue-resident memory T cells at the center of immunity to solid tumors. *Nat Immunol* (2018) **19**:1–9. doi:10.1038/s41590-018-0114-2
97. Mami-Chouaib F, Blanc C, Corgnac S, Hans S, Malenica I, Granier C, Tihy I, Tartour E. Resident memory T cells, critical components in tumor immunology. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* (2018) **6**:1–10. doi:10.1186/s40425-018-0399-6
98. Djenidi F, Adam J, Goubar A, Durgeau A, Meurice G, de Montpréville V, Validire P, Besse B, Mami-Chouaib F. CD8⁺CD103⁺Tumor-Infiltrating Lymphocytes Are Tumor-Specific Tissue-Resident Memory T Cells and a Prognostic Factor for Survival in Lung Cancer Patients. *The Journal of Immunology* (2015) **194**:3475–3486. doi:10.4049/jimmunol.1402711
99. Ganesan A-P, Clarke J, Wood O, Garrido-Martin EM, Chee SJ, Mellows T, Samaniego-Castruita D, Singh D, Seumois G, Alzetani A, et al. Tissue-resident memory features are linked to the magnitude of cytotoxic T cell responses in human lung cancer. *Nat Immunol* (2017) **18**:940–950. doi:10.1038/ni.3775
100. Floc'h AL, Jalil A, Vergnon I, Chansac BLM, Lazar V, Bismuth G, Chouaib S, Mami-Chouaib F. α E β 7 integrin interaction with E-cadherin promotes

- antitumor CTL activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis. *J Exp Med* (2007) **204**:559–570. doi:10.1084/jem.20061524
101. Parker BS, Rautela J, Hertzog PJ. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nature Publishing Group* (2016)1–14. doi:10.1038/nrc.2016.14
 102. Wang W, Kryczek I, Dostál L, Lin H, Tan L, Zhao L, Lu F, Wei S, Maj T, Peng D, et al. Effector T Cells Abrogate Stroma-Mediated Chemoresistance in Ovarian Cancer. *Cell* (2016) **165**:1092–1105. doi:10.1016/j.cell.2016.04.009
 103. Zitvogel L, Galluzzi L, Smyth MJ, Kroemer G. Mechanism of Action of Conventional and Targeted Anticancer Therapies: Reinstating Immunosurveillance. *Immunity* (2013) **39**:74–88. doi:10.1016/j.immuni.2013.06.014
 104. Schenkel JM, Fraser KA, Vezys V, Masopust D. Sensing and alarm function of resident memory CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* (2013) **14**:509–513. doi:10.1038/ni.2568
 105. Brewitz A, Eickhoff S, Dähling S, Quast T, Bedoui S, Kroczeck RA, Kurts C, Garbi N, Barchet W, Iannacone M, et al. CD8⁺ T Cells Orchestrate pDC-XCR1⁺ Dendritic Cell Spatial and Functional Cooperativity to Optimize Priming. *Immunity* (2017) **46**:205–219. doi:10.1016/j.immuni.2017.01.003
 106. Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, Diamond M, Matsushita H, Kohyama M, Calderon B, Schraml BU, Unanue ER, Diamond MS, et al. Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8⁺ Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity. *Science* (2008) **322**:1097–1100. doi:10.1126/science.1164206
 107. Roberts EW, Broz ML, Binnewies M, Headley MB, Nelson AE, Wolf DM, Kaisho T, Bogunovic D, Bhardwaj N, Krummel MF. Critical Role for CD103⁺/CD141⁺ Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and Priming of T Cell Immunity in Melanoma. *Cancer Cell* (2016) **30**:324–336. doi:10.1016/j.ccell.2016.06.003
 108. Komdeur FL, Prins TM, van de Wall S, Plat A, Wisman GBA, Hollema H, Daemen T, Church DN, de Bruyn M, Nijman HW. CD103⁺ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor- reactive intraepithelial CD8⁺ T cells associated with prognostic benefit and therapy response in cervical cancer. *OncImmunology* (2017) **6**:1–14. doi:10.1080/2162402X.2017.1338230
 109. Nizard M, Karaki S, Tran T, Voron T, Dransart E, Sandoval F, Riquet M, Rance B, Marcheteau E, Fabre E, et al. Induction of resident memory T cells enhances the efficacy of cancer vaccine. *Nature Communications* (2017) **8**:1–11. doi:10.1038/ncomms15221

110. Wang B, Wu S, Zeng H, Liu Z, Dong W, He W, Chen X, Dong X, Zheng L, Lin T, et al. CD103+Tumor Infiltrating Lymphocytes Predict a Favorable Prognosis in Urothelial Cell Carcinoma of the Bladder. *Journal of Urology* (2015)1–7. doi:10.1016/j.juro.2015.02.2941
111. Wang ZQ, Milne K, Derocher H, Webb JR, Nelson BH, Watson PH. CD103 and Intratumoral Immune Response in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* (2016) **22**:6290–6297. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0732
112. Workel HH, Komdeur FL, Wouters MCA, Plat A, Klip HG, Eggink FA, Wisman GBA, Arts HJG, Oonk MHM, Mourits MJE, et al. CD103 defines intraepithelial CD8+ PD1+ tumour-infiltrating lymphocytes of prognostic significance in endometrial adenocarcinoma. *European Journal of Cancer* (2016) **60**:1–11. doi:10.1016/j.ejca.2016.02.026
113. Komdeur FL, Wouters MCA, Workel HH, Tijans AM, Terwindt ALJ, Brunekreeft KL, Plat A, Klip HG, Eggink FA, Leffers N, et al. CD103+ intraepithelial T cells in high-grade serous ovarian cancer are phenotypically diverse TCR $\alpha\beta$ + CD8 $\alpha\beta$ + T cells that can be targeted for cancer immunotherapy. *Oncotarget* (2016) **7**:75130–75144. doi:10.18632/oncotarget.12077
114. Koh J, Kim S, Kim M-Y, Go H, Jeon YK, Chung DH. Prognostic implications of intratumoral CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes in pulmonary squamous cell carcinoma. *Oncotarget* (2017) **8**:13762–13769. doi:10.18632/oncotarget.14632
115. Dhodapkar MV, Dhodapkar KM. Tissue-resident memory-like T cells in tumor immunity: Clinical implications. *Seminars in Immunology* (2020) **49**:101415. doi:10.1016/j.smim.2020.101415
116. Edwards J, Wilmott JS, Madore J, Gide TN, Quek C, Tasker A, Ferguson A, Chen J, Hewavisenti R, Hersey P, et al. 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* (2018) **24**:3036–3045. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2257
117. Malik BT, Byrne KT, Vella JL, Zhang P, Shabaneh TB, Steinberg SM, Molodtsov AK, Bowers JS, Angeles CV, Paulos CM, et al. Resident memory T cells in the skin mediate durable immunity to melanoma. *Sci Immunol* (2017) **2**:eaam6346–24. doi:10.1126/sciimmunol.aam6346
118. Sun YY, Peng S, Han L, Qiu J, Song L, Tsai Y, Yang B, Roden RBS, Trimble CL, Hung CF, et al. Local HPV Recombinant Vaccinia Boost Following Priming with an HPV DNA Vaccine Enhances Local HPV-Specific CD8+ T-cell-Mediated Tumor Control in the Genital Tract. *Clinical Cancer Research* (2016) **22**:657–669. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0234

119. Gálvez-Cancino F, López E, Menares E, Díaz X, Flores C, Cáceres P, Hidalgo S, Chovar O, Alcántara-Hernández M, Borgna V, et al. Vaccination-induced skin-resident memory CD8 T cells mediate strong protection against cutaneous melanoma. *OncoImmunology* (2018) **7**:1–12. doi:10.1080/2162402X.2018.1442163
120. Kadoki M, Patil A, Thaiss CC, Brooks DJ, Pandey S, Deep D, Alvarez D, Andrian von UH, Wagers AJ, Nakai K, et al. Organism-Level Analysis of Vaccination Reveals Networks of Protection across Tissues. *Cell* (2017) **171**:398–401.e21. doi:10.1016/j.cell.2017.08.024
121. Ariotti S, Beltman JB, Chodaczek G, Hoekstra ME, van Beek AE, Gomez-Eerland R, Ritsma L, van Rheenen J, Marée AFM, Zal T, et al. Tissue-resident memory CD8⁺ T cells continuously patrol skin epithelia to quickly recognize local antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* (2012) **109**:19739–19744. doi:10.1073/pnas.1208927109
122. Hombrink P, Helbig C, Backer RA, Piet B, Oja AE, Stark R, Brassler G, Jongejan A, Jonkers RE, Nota B, et al. Programs for the persistence, vigilance and control of human CD8⁺ lung-resident memory T cells. *Nat Immunol* (2016) **17**:1467–1478. doi:10.1038/ni.3589
123. Boddupalli CS, Bar N, Kadaveru K, Krauthammer M, Pornputtpong N, Mai Z, Ariyan S, Narayan D, Kluger H, Deng Y, et al. Interlesional diversity of T cell receptors in melanoma with immune checkpoints enriched in tissue-resident memory T cells. *JCI Insight* (2016) **1**:443–13. doi:10.1172/jci.insight.88955
124. Hartana CA, Ahlén Bergman E, Broomé A, Berglund S, Johansson M, Alamdari F, Jakubczyk T, Hüge Y, Aljabery F, Palmqvist K, et al. Tissue-resident memory T cells are epigenetically cytotoxic with signs of exhaustion in human urinary bladder cancer. *Clin Exp Immunol* (2018) **194**:39–53. doi:10.1111/cei.13183
125. Beura LK, Mitchell JS, Thompson EA, Schenkel JM, Mohammed J, Wijeyesinghe S, Fonseca R, Burbach BJ, Hickman HD, Vezys V, et al. Intravital mucosal imaging of CD8⁺ resident memory T cells shows tissue-autonomous recall responses that amplify secondary memory. *Nat Immunol* (2018) 1–16. doi:10.1038/s41590-017-0029-3
126. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Publishing Group* (2015) **15**:486–499. doi:10.1038/nri3862
127. Miller BC, Sen DR, Abosy AI R, Bi K, Virkud YV, LaFleur MW, Yates KB, Lako A, Felt K, Naik GS, et al. Subsets of exhausted CD8⁺ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat Immunol* (2019) **20**:326–336. doi:10.1038/s41590-019-0312-6

128. Shan Q, Hu S, Chen X, Danahy DB, Badovinac VP, Zang C, Xue H-H. Ectopic Tcf1 expression instills a stem-like program in exhausted CD8+ T cells to enhance viral and tumor immunity. *Cellular and Molecular Immunology* (2020)
129. Utzschneider DT, Charmoy M, Chennupati V, Pousse L, Ferreira DP, Calderon-Copete S, Danilo M, Alfei F, Hofmann M, Wieland D, et al. T Cell Factor 1-Expressing Memory-like CD8+ T Cells Sustain the Immune Response to Chronic Viral Infections. *Immunity* (2016) **45**:415–427. doi:10.1016/j.immuni.2016.07.021
130. Im SJ, Hashimoto M, Gerner MY, Lee J, Kissick HT, Burger MC, Shan Q, Hale JS, Lee J, Nasti TH, et al. Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature* (2016) **537**:417–421. doi:10.1038/nature19330
131. Blackburn SD, Shin H, Freeman GJ, Wherry EJ. Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by α PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2008) **105**:15016–15021. doi:10.1073/pnas.0801497105
132. Sade-Feldman M, Yizhak K, Bjorgaard SL, Ray JP, de Boer CG, Jenkins RW, Lieb DJ, Chen JH, Frederick DT, Barzily-Rokni M, et al. Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma. *Cell* (2018) **175**:998–1013.e20. doi:10.1016/j.cell.2018.10.038
133. Shahbaz S, Dunsmore G, Koleva P, Xu L, Houston S, Elahi S. Galectin-9 and VISTA Expression Define Terminally Exhausted T Cells in HIV-1 Infection. *J Immunol* (2020) **204**:2474–2491. doi:10.4049/jimmunol.1901481
134. LaFleur MW, Nguyen TH, Coxe MA, Miller BC, Yates KB, Gillis JE, Sen DR, Gaudio EF, Abosy AI, Freeman GJ, et al. PTPN2 regulates the generation of exhausted CD8+ T cell subpopulations and restrains tumor immunity. *Nat Immunol* (2019) **20**:1–20. doi:10.1038/s41590-019-0480-4
135. Jansen CS, Prokhnevskaya N, Master VA, Sanda MG, Carlisle JW, Bilen MA, Cardenas M, Wilkinson S, Lake R, Sowalsky AG, et al. An intra-tumoral niche maintains and differentiates stem-like CD8 T cells. *Nature* (2019) **576**:465–470. doi:10.1038/s41586-019-1836-5
136. Brummelman J, Mazza EMC, Alvisi G, Colombo FS, Grilli A, Mikulak J, Mavilio D, Alloisio M, Ferrari F, Lopci E, et al. High-dimensional single cell analysis identifies stem-like cytotoxic CD8+ T cells infiltrating human tumors. *J Exp Med* (2018) **215**:2520–2535. doi:10.1084/jem.20180684
137. Beltra J-C, Manne S, Abdel-Hakeem MS, Kurachi M, Giles JR, Chen Z, Casella V, Ngiow SF, Khan O, Huang YJ, et al. Developmental Relationships of Four Exhausted CD8+ T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional

- and Epigenetic Landscape Control Mechanisms. *Immunity* (2020) **52**:825–841.e8. doi:10.1016/j.immuni.2020.04.014
138. Kallies A, Zehn D, Utzschneider DT. Precursor exhausted T cells: key to successful immunotherapy? *Nature Publishing Group* (2020)1–9. doi:10.1038/s41577-019-0223-7
139. Siddiqui I, Schaeuble K, Chennupati V, Marraco SAF, Calderon-Copete S, Ferreira DP, Carmona SJ, Scarpellino L, Gfeller D, Pradervand S, et al. Intratumoral Tcf1+PD-1+CD8+ T Cells with Stem-like Properties Promote Tumor Control in Response to Vaccination and Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Immunity* (2019) **50**:195–211.e10. doi:10.1016/j.immuni.2018.12.021
140. Ly LV, Sluijter M, Versluis M, Luyten GPM, van der Burg SH, Melief CJM, Jager MJ, van Hall T. Peptide Vaccination after T-Cell Transfer Causes Massive Clonal Expansion, Tumor Eradication, and Manageable Cytokine Storm. *Cancer Research* (2010) **70**:8339–8346. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2288
141. Ly LV, Sluijter M, van der Burg SH, Jager MJ, van Hall T. Effective Cooperation of Monoclonal Antibody and Peptide Vaccine for the Treatment of Mouse Melanoma. *The Journal of Immunology* (2012) **190**:489–496. doi:10.4049/jimmunol.1200135
142. Durgeau A, Virk Y, Corgnac S, Mami-Chouaib F. Recent Advances in Targeting CD8 T-Cell Immunity for More Effective Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* (2018) **9**:152–14. doi:10.3389/fimmu.2018.00014
143. Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S-I, Soares H, Brimnes MK, Moltedo B, Moran TM, Steinman RM. In Vivo Targeting of Antigens to Maturing Dendritic Cells via the DEC-205 Receptor Improves T Cell Vaccination. *J Exp Med* (2004) **199**:815–824. doi:10.1084/jem.20032220
144. Molodtsov A, Turk MJ. Tissue Resident CD8 Memory T Cell Responses in Cancer and Autoimmunity. *Front Immunol* (2018) **9**:779–18. doi:10.3389/fimmu.2018.02810
145. Thommen DS, Schumacher TN. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell* (2018) **33**:547–562. doi:10.1016/j.ccell.2018.03.012
146. Liu Y, Zhou N, Zhou L, Wang J, Zhou Y, Zhang T, Fang Y, Deng J, Gao Y, Liang X, et al. IL-2 regulates tumor-reactive CD8+ T cell exhaustion by activating the aryl hydrocarbon receptor. *Nat Immunol* (2021)1–30. doi:10.1038/s41590-020-00850-9
147. Kurd NS, He Z, Louis TL, Milner JJ, Omilusik KD, Jin W, Tsai MS, Widjaja CE, Kanbar JN, Olvera JG, et al. Early precursors and molecular determinants

- of tissue-resident memory CD8⁺ T lymphocytes revealed by single-cell RNA sequencing. *Sci Immunol* (2020) **5**: doi:10.1126/sciimmunol.aaz6894
148. Rutishauser RL, Martins GA, Kalachikov S, Chandele A, Parish IA, Meffre E, Jacob J, Calame K, Kaech SM. Transcriptional Repressor Blimp-1 Promotes CD8⁺ T Cell Terminal Differentiation and Represses the Acquisition of Central Memory T Cell Properties. *Immunity* (2009) **31**:296–308. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.014
 149. Mackay LK, Minnich M, Kragten NAM, Liao Y, Nota B, Seillet C, Zaid A, Man K, Preston S, Freestone D, et al. Hobit and Blimp1 instruct a universal transcriptional program of tissue residency in lymphocytes. *Science* (2016) **352**:459–463. doi:10.1126/science.aad2035
 150. Wu T, Ji Y, Moseman EA, Xu HC, Manglani M, Kirby M, Anderson SM, Handon R, Kenyon E, Elkahlon A, et al. The TCF1-Bcl6 axis counteracts type I interferon to repress exhaustion and maintain T cell stemness. *Sci Immunol* (2016) **1**:eaai8593–eaai8593. doi:10.1126/sciimmunol.aai8593
 151. Wang D, Zhuang L, Gao B, Shi C-X, Cheung J, Liu M, Jin T, Wen X-Y. The Blimp-1 gene regulatory region directs EGFP expression in multiple hematopoietic lineages and testis in mice. *Transgenic Res* (2007) **17**:193–203. doi:10.1007/s11248-007-9140-9
 152. Kallies A, Xin A, Belz GT, Nutt SL. Blimp-1 Transcription Factor Is Required for the Differentiation of Effector CD8⁺ T Cells and Memory Responses. *Immunity* (2009) **31**:283–295. doi:10.1016/j.immuni.2009.06.021
 153. van Gisbergen KPJM, Kragten NAM, Hertoghs KML, Wensveen FM, Jonjic S, Hamann J, Nolte MA, van Lier RAW. Mouse Hobit is a homolog of the transcriptional repressor Blimp-1 that regulates NKT cell effector differentiation. *Nat Immunol* (2012) **13**:864–871. doi:10.1038/ni.2393
 154. Wu J, Madi A, Mieg A, Hotz-Wagenblatt A, Weisshaar N, Ma S, Mohr K, Schlimbach T, Hering M, Borgers H, et al. T Cell Factor 1 Suppresses CD103⁺ Lung Tissue-Resident Memory T Cell Development. *CellReports* (2020) **31**:107484. doi:10.1016/j.celrep.2020.03.048
 155. Moreira A, Heinzerling L, Bhardwaj N, Friedlander P. Current Melanoma Treatments: Where Do We Stand? *Cancers* (2021) **13**:221–12. doi:10.3390/cancers13020221
 156. Blank CU, Reijers ILM, Pennington T, Versluis JM, Saw RP, Rozeman EA, Kapiteijn E, Van Der Veldt AAM, Suijkerbuijk K, Hospers G, et al. First safety and efficacy results of PRADO: A phase II study of personalized response-driven surgery and adjuvant therapy after neoadjuvant ipilimumab (IPI) and nivolumab (NIVO) in resectable stage III melanoma. *JCO* (2020) **38**:10002–10002. doi:10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.10002

157. Bhave P, Pallan L, Atkinson V, Cohen JV, Chiarion-Sileni V, Nyakas M, Kaehler KC, Plummer E, Ascierto PA, Zimmer L, et al. Melanoma recurrence after adjuvant targeted therapy: A multicenter analysis. *JCO* (2020) **38**:10016–10016. doi:10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.10016
158. Rozeman EA, Reijers ILM, Hoefsmit EP, Sikorska K, Krijgsman O, Van De Wiel BA, Dimitriadis P, Eriksson H, Gonzalez M, Grijpink-Ongering LG, et al. Twenty-four months RFS and updated toxicity data from OpACIN-neo: A study to identify the optimal dosing schedule of neoadjuvant ipilimumab (IPI) and nivolumab (NIVO) in stage III melanoma. *JCO* (2020) **38**:10015–10015. doi:10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.10015
159. Garutti M, Buriolla S, Bertoli E, Vitale MG, Rossi E, Schinzari G, Minisini AM, Puglisi F. “To Anticipate”: Neoadjuvant Therapy in Melanoma with a Focus on Predictive Biomarkers. *Cancers* (2020) **12**:1941. doi:10.3390/cancers12071941
160. Corrales L, Woo S-R, Williams JB, McWhirter SM, Dubensky TW, Gajewski TF. Antagonism of the STING Pathway via Activation of the AIM2 Inflammasome by Intracellular DNA. *J Immunol* (2016) **196**:3191–3198. doi:10.4049/jimmunol.1502538
161. Dhanak D, Edwards JP, Nguyen A, Tummino PJ. Small-Molecule Targets in Immuno-Oncology. *Cell Chemical Biology* (2017) **24**:1148–1160. doi:10.1016/j.chembiol.2017.08.019
162. Ramanjulu JM, Pesiridis GS, Yang J, Concha N, Singhaus R, Zhang S-Y, Tran J-L, Moore P, Lehmann S, Eberl HC, et al. Design of amidobenzimidazole STING receptor agonists with systemic activity. *Nature* (2019)1–16. doi:10.1038/s41586-018-0705-y
163. Slingluff CL, Blumenstein BA, Lewis KD, Andtbacka RHI, Hyngstrom JR, Milhem MM, Markovic S, Hamid O, Hernandez-Aya LF, Bowles TL, et al. Final analysis of relapse-free survival in a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of seviprotimut-L polyvalent melanoma vaccine after resection of high-risk melanoma. *JCO* (2020) **38**:10017–10017. doi:10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.10017
164. Loquai C, Hassel JC, Oehm P, Derhovanessian E, Jabulowsky RA, Gold M, Schwarck-Kokarakis D, Attig S, Cuk K, Vogler I, et al. A shared tumor-antigen RNA-lipoplex vaccine with/without anti-PD1 in patients with checkpoint-inhibition experienced melanoma. *JCO* (2020) **38**:3136–3136. doi:10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.3136