



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

***Evaluación fenotípica y funcional de células T CD8  
agotadas en un modelo de resistencia a inmunoterapia en  
melanoma.***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Julián Argenis Gajón Martínez

TUTOR PRINCIPAL:  
Dra. Laura Bonifaz Alfonso  
Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Ezequiel Fuentes Panana.  
Facultad de Química

Dra. Diana Escalante Alcalde  
Instituto de Fisiología Celular

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., Febrero, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



## JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. José Carlos Crispín Acuña

VOCAL: Dra. Rosana Pelayo Camacho

VOCAL: Dra. Ingebor Dorothea Becker Fauser

VOCAL: Dr. Gustavo Pedraza Alva

SECRETARIO: Dra. Paula Licona Limón

## SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio de Inmunología Célular de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica. Hospital de Especialidades, “Bernardo Sepúlveda” del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

*A mi madre*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la Dra Laura Bonifaz por todo su apoyo y confianza. Por ser mi guía profesional y por ese empeño en obtener la mejor versión de mi.

Agradezco también a los miembros de mi comité tutor; Al Dr. Ezequiel Fuentes Panana quien ha sido muy objetivo y optimista con los resultados obtenidos en este trabajo. De igual forma la Dra. Diana Escalante quien estuvo muy atenta a los resultados obtenidos y a mi desarrollo académico. Ambos fueron excelentes tutores.

Agradezco también a mi jurado por elevar el nivel de este trabajo con sus sugerencias.

Una mención muy especial al posgrado en Ciencias bioquímicas y a la UNAM por formarme como maestro en ciencias bioquímicas.

Por ultimo, este trabajo pudo realizarse gracias al apoyo numero 750615 del CONACYT. Asi mismo, quisiera volver a agradecer a la Dra. Laura Bonifaz y a su esposo Daniel Acosta por apoyarme en este último tramo de mi maestría. Fueron el motor económico que me permitió concluir este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Este trabajo de tesis es el pináculo de todo un conjunto de experiencias personales, académicas e inclusive colectivas. Las cuales fueron mas fáciles de llevar en compañía de personas especiales a quienes les estoy agradecido porque de una manera u otra me ayudaron en este camino.

Entre ellos, mis compañeros de laboratorio, quienes, si me lo permiten, podrían compararse a los timocitos, día a día formándose para ser las mejores células efectoras.

Timocitos que en su biología tienen un peculiar desarrollo, forzados a aguantar presiones selectivas que otros tipos celulares no sufren. Algunos apenas DPs, otros como Ara, completamente CD8 o Eli casi CD4. Sé que Ara añora que la compare con una DC, pero todos sabemos que, la única DC que nos presenta antígeno para saber si somos auto reactivos y reconocemos el MHC propio, es la Dra Bonifaz. Agradezco también el apoyo de Paty quien su ternura y enseñanza me recuerda a las células estromales timicas, estando siempre dispuesta a apoyar a uno que otro timocito que ha perdido el camino.

Pero, ¿Qué sería de las células sin estímulos ambientales, sin citocinas, nutrientes? Y es ahí donde han jugado un papel importante mis amigos (Si tengo). Quienes nutren mi alma y generan un microambiente tal que me ha permitido seguir adelante.

Hablando de señales positivas de sobrevivencia en un timocito DP, he estado pensando sobre el papel de lili en esta historia. Sin duda su calidez, cuidado y lo bien que me siento en su compañía, me recuerdan lo bien que crecen las células en cultivo, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Hay veces que lili también es el ojo detrás del microscopio que me cuida, y me guía en el camino, cuando observa algo anormal en el modo en que difracta la luz. Siendo mas inmunes, lili es mi anti PD-1 que me rescata del agotamiento.

Por último, toda célula tiene un linaje y comparte precursores con otras células, que si bien pueden ser diferentes en función, comparten el mismo genotipo. Una célula no es nada sin su línea germinal. Y es ahí donde agradezco a toda mi familia por el apoyo incondicional. Pero sobre todo agradezco a mi madre, mi precursor directo, quien en algún momento de su vida tuvo el valor de dividirse asimétricamente y dar lugar a una nueva célula, cuidarla y proveer todos los factores de crecimiento que me llevaron a aspirar a ser un buen linfocito. Agradezco también a el otro producto de su división asimétrica, mi hermanita, a quien admiro y quiero mucho.

Gracias a todos y cada uno de los eucariontes que coexisten conmigo, por el valor de transmutar constantemente energía y materia y por ser fuente de luz.



# ÍNDICE

<b>ÍNDICE.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>X</b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS. ....</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>1. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
<b>EL CÁNCER COMO PROBLEMA DE SALUD. ....</b>	<b>3</b>
<b>RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL .....</b>	<b>4</b>
<b>INMUNOEDICIÓN EN CÁNCER .....</b>	<b>5</b>
<b>LA INMUNOTERAPIA.....</b>	<b>7</b>
<b>MECANISMOS DE LOS BLANCOS DE INMUNOTERAPIA ANTI-CTLA-4 Y ANTI-PD-1 .....</b>	<b>8</b>
<b>AGOTAMIENTO DE LINFOCITOS T .....</b>	<b>10</b>
<b>EL AGOTAMIENTO Y SU RELACIÓN CON LA RESPUESTA A INMUNOTERAPIA .....</b>	<b>16</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>17</b>
<b>2. HIPÓTESIS.....</b>	<b>18</b>
<b>3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>18</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>18</b>
<b>5. METODOLOGÍA.....</b>	<b>19</b>
<b>5.1 RATONES .....</b>	<b>19</b>
<b>5.2 CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES.....</b>	<b>19</b>
<b>5.3 OBTENCIÓN DE TUMORES SENSIBLES Y RESISTENTES A INMUNOTERAPIA.....</b>	<b>19</b>
<b>5.4 OBTENCIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE TUMORES RESISTENTES A INMUNOTERAPIA.....</b>	<b>20</b>

5.5 OBTENCIÓN DE CÉLULAS LINFOIDES DE TEJIDOS LINFOIDES SECUNDARIOS. ....	20
5.6 CITOMETRÍA DE FLUJO.....	21
5.7 INMUNOFLUORESCENCIA. ....	21
5.8 OBTENCIÓN DE ESFEROIDES TUMORALES Y CO-CULTIVO CON CÉLULAS OTI .....	22
5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	22
<b><u>6. RESULTADOS .....</u></b>	<b><u>23</u></b>
6.1 OBTENCIÓN DE TUMORES DE MELANOMA SENSIBLES Y RESISTENTES A INMUNOTERAPIA ANTI-PD-1 .....	23
6.2 LA RESISTENCIA A INMUNOTERAPIA ANTI-PD1 INVOLUCRA UNA DISMINUCIÓN EN EL INFILTRADO DE LINFOCITOS CD8 TEX .....	25
6.3 EL DECREMENTO DE CÉLULAS CD8 TEX EN EL CONTEXTO DE LA RESISTENCIA A INMUNOTERAPIA ANTI-PD1 SE ACOMPAÑA POR UN BAJO INFILTRADO DE CÉLULAS CD8TPEX. ..	27
6.4 LAS CÉLULAS DE MELANOMA MURINO FORMAN ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES (ESFEROIDES) EN CULTIVOS IN VITRO.....	30
6.5 EL CONTACTO DE ESFEROIDES TUMORALES DE MELANOMA MURINO CON LINFOCITOS OTI INDUCE LA EXPRESIÓN DE PD-1. ....	32
6.6 LA ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS OTI POR EL CONTACTO DE ESFEROIDES TUMORALES ES DISTINTA A LA ACTIVACIÓN CON PHA. ....	34
6.7 EL CONTACTO DE CÉLULAS OTI CON ESFEROIDES TUMORALES DE CELULAS RESISTENTES A INMUNOTERAPIA INDUCE LA ACUMULACIÓN DE PROGENITORES EXHAUSTOS .....	36
6.9 EL CONTACTO DE CÉLULAS OTI DEFICIENTES DE PD-1 CON ESFEROIDES TUMORALES DE LÍNEAS RESISTENTES A INMUNOTERAPIA ACENTÚA LA ACUMULACIÓN DE PRECURSORES DE TEX. ....	39
<b><u>7. DISCUSIÓN.....</u></b>	<b><u>41</u></b>
<b><u>8.CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....</u></b>	<b><u>50</u></b>
8.1 CONCLUSIONES .....	50
8.2 PERSPECTIVAS.....	50
<b><u>9. ANEXO.....</u></b>	<b><u>52</u></b>
ESTRATEGIA DE ANÁLISIS DE CITOMETRÍA .....	52
<b><u>10.BIBLIOGRAFÍA.....</u></b>	<b><u>53</u></b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b><i>Figura 1. Inmunoección en cáncer</i></b>	<b>Página 6</b>
<b><i>Figura 2. Camino de diferenciación de los linfocitos T agotados.</i></b>	<b>Página 15</b>
<b><i>Figura 3. Los tumores sensibles a inmunoterapia presentan un mayor infiltrado de linfocitos T CD8.</i></b>	<b>Página 24</b>
<b><i>Figura 4: Incremento de células CD8T<sub>ex</sub> (TIM-3+, PD-1+) en tumores sensibles a inmunoterapia anti-PD-1.</i></b>	<b>Página 26</b>
<b><i>Figura 5: El Incremento de células CD8T<sub>ex</sub> en tumores sensibles a inmunoterapia anti-PD-1 se relaciona con la expresión de TCF-1.</i></b>	<b>Página 29</b>
<b><i>Figura 6: Desarrollo de esferoides tumorales como modelo in vitro para el estudio de mecanismos de resistencia a inmunoterapia.</i></b>	<b>Página 31</b>
<b><i>Figura 7: Las células OTI en contacto con esferoides tumorales singénicos expresan PD-1.</i></b>	<b>Página 33</b>
<b><i>Figura 8: Diferencias Fenotípicas en Linfocitos OTI activados con PHA o con esferoides de MO4 in vitro.</i></b>	<b>Página 35</b>
<b><i>Figura 9: Diferencias Fenotípicas en Linfocitos OTI co-cultivados con esferoides de MO4 y células resistentes a inmunoterapia.</i></b>	<b>Página 38</b>
<b><i>Figura 10: El contacto de Células OTI PD-1<sup>-/-</sup> con esferoides tumorales de líneas resistentes a inmunoterapia induce un incremento de células precursoras exhaustas.</i></b>	<b>Página 40</b>
<b><i>Figura 11: Modelo propuesto para la resistencia a inmunoterapia anti PD-1.</i></b>	<b>Página 51</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

Ordenado alfabéticamente por sus siglas en inglés.

<b>AKT</b>	AKT Serine/Threonin Kinase. Conocida también como Proteína cinasa B.
<b>AMP</b>	Adenosine monophosphate. Adenosin Monofosfato
<b>APC</b>	Antigen Presenting Cell. Célula presentadora de antígeno
<b>ATP</b>	Adenosine Triphosphate. Adenosin Trifosfato
<b>B7</b>	B7 family protein. Familia de proteínas de superficie co-estimuladoras como B7-1 y B7-2 (CD80/CD86)
<b>B7h</b>	B7 homolog. Homólogos proteicos de la familia B7 con actividad supresora como PD-L1 y PD-L2
<b>BCL6</b>	B cell lymphoma 6. Represor transcripcional en células linfoides, asociado a células foliculares.
<b>CCR7</b>	C-C Chemokine Receptor type 7. Receptor de quimiocinas que dirige a las células inmunitarias hacia nódulos linfáticos
<b>CD4</b>	Cluster of Differentiation 4. Proteína correceptora expresada en linfocitos T cooperadores
<b>CD8</b>	Cluster of Differentiation 8. Proteína correceptora expresada en linfocitos T citotóxicos
<b>CD28</b>	Cluster of Differentiation 28. Proteína de estimulación expresada en células T
<b>CD39</b>	Cluster of Differentiation 39. Ectonucleotidasa que transforma ATP en ADP.
<b>CD44</b>	Cluster of Differentiation 44. Proteína de superficie involucrada en la adhesión celular. Expresada en células T no vírgenes.
<b>CD45</b>	Cluster of Differentiation 45. Proteína tirosina fosfatasa expresada mayoritariamente por células de origen hematopoyético.
<b>CD69</b>	Cluster of Differentiation 69. Proteína tipo lectina asociada a la activación de linfocitos T.
<b>CD73</b>	Cluster of Differentiation 73. Ectonucleotidasa que cataliza la conversión de AMP a adenosina.
<b>CD80</b>	Cluster of Differentiation 80. Proteína de estimulación de la familia B7 expresada en células presentadoras de antígeno
<b>CD86</b>	Cluster of Differentiation 86. Proteína de co-estimulación de la familia B7 expresada en células presentadoras de antígeno.
<b>CTLA-4</b>	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4. Receptor de moléculas de co-estimulación expresado en células T

<b>CXCR5</b>	C-X Chemokine Receptor type 5. Receptor de quimiocinas que dirige a las células inmunitarias hacia los folículos de los nódulos linfáticos.
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum. Suero fetal bovino
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein. Proteína verde fluorescente.
<b>GZMB</b>	Granzyme B. Serina proteasa expresada por células citotóxicas
<b>ICB</b>	Immune Checkpoint Blockade. Bloqueo de puntos de inhibición de células inmunitarias como el receptor PD-1 en linfocitos T
<b>ICOS</b>	Inducible T Cell Costimulator. Molécula de co-estimulación expresada en linfocitos T activados, principalmente Th2 y T foliculares.
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gamma. Citocina expresada por células inmunitarias principalmente células Th1 y células T CD8
<b>Ki67</b>	Ki67 antígeno. Proteína nuclear asociada a la proliferación celular.
<b>LAG3</b>	Lymphocyte Activating Gene 3. Proteína de membrana expresada en células T que funciona como receptor de punto de control
<b>LCMV</b>	Lymphocytic Choriomeningitis Virus. Virus causante de la coriomeningitis aguda en ratones
<b>MCF7</b>	Michigan Cancer Foundation 7. Es una línea celular de cáncer de mama, aislada en 1970 de una paciente caucásica de 69 años.
<b>MO4</b>	Melanoma OVA cell line 4. Línea celular de melanoma murino derivada de la línea B16. Que expresa constitutivamente péptidos de ovalbúmina.
<b>OTI</b>	OVA Transgenic t cell receptor 1 cell. Células T transgénicas que expresan un TCR específico para péptidos de OVA presentados en el contexto de MCH-1
<b>OVA</b>	Ovalbumin. Ovalbúmina, constituye en un 55% las proteínas de la clara de huevo. Debido a su inmunogenicidad y asequibilidad es utilizado como modelo antigénico
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline. Solución reguladora del potencial de hidrógeno isotónica constituida por sales de fosfato que normalmente se usa en el procesamiento de suspensiones celulares
<b>PD-1</b>	Programmed Cell Death protein 1. Receptor de inhibición de punto de control expresado en linfocitos T activados y agotados.
<b>PD-L1</b>	Programmed Cell Death Ligand 1. Ligando de PD-1 expresado por diversas células con el fin de inhibir la función de los linfocitos T
<b>PD-L2</b>	Programmed Cell Death Ligand 2. Ligando de PD-1 expresado por células dendríticas con el fin de modular la activación de los linfocitos T
<b>PHA</b>	Phytohemagglutinin. Lectina de origen vegetal con función mitótica sobre linfocitos debido a su capacidad aglutinante
<b>R1</b>	Resistant 1. Células de melanoma murino derivadas de tumores de MO4 resistentes a inmunoterapia anti-PD1
<b>RBC</b>	Red Blood Cell. Eritrocitos

<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute media. Medio de cultivo, optimizado para el desarrollo de células de origen animal.
<b>SHP2</b>	SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-2. Fosfatasa citoplasmática que participa en la regulación de diversas vías de señalización.
<b>SLAMF6</b>	SLAM Family 6 protein. Inmunoglobulina expresada por diversas células linfoides, particularmente células T CD8 agotadas precursoras
<b>T Bet</b>	T-box transcription factor. Es un factor de transcripción expresado por células Th1 y CD8 productoras de IFN- $\gamma$
<b>TCF1</b>	T Cell Factor 1. Factor de transcripción expresado por diversas células linfoides, expresado principalmente por timocitos y células T maduras con fenotipo precursor
<b>TCR</b>	T Cell Receptor. Receptor de células T
<b>Tex</b>	T cell Exhausted. Células T agotadas
<b>Tex int</b>	T cell Exhausted intermediate. Células T agotadas intermedias
<b>Texterm</b>	T cell Exhausted Terminal. Células T agotadas terminales
<b>Th1</b>	T cell helper 1. Células T CD4 cooperadoras tipo 1
<b>TIGIT</b>	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains. Receptor de inhibición de punto de control expresado por células T.
<b>TILs</b>	Tumor Infiltrating Lymphocytes. Linfocitos T infiltrantes de tumor
<b>TIM3</b>	T cell immunoglobulin and mucin domain containing protein 3. Proteína de inhibición de punto de control expresada por linfocitos T, principalmente agotados.
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor alpha. Citocina de origen inmune que participa en procesos inflamatorios.
<b>TOX</b>	Thymocyte selection-associated high mobility group box protein. Factor de transcripción asociado a la actividad de linfocitos T
<b>Tpex</b>	T cell exhausted precursor. Células T agotadas con fenotipo precursor
<b>Tpex1</b>	T cell exhausted precursor 1. Células T agotadas con fenotipo precursor 1
<b>Tpex2</b>	T cell exhausted precursor 2. Células T agotadas con fenotipo precursor 2.
<b>Treg</b>	Regulatory T cells. Células T CD4 reguladoras
<b>V<math>\beta</math>5.1</b>	Variable beta chain 5.1. Cadena variable del TCR que reconoce de entre distintos determinantes antigénicos, péptidos de OVA
<b>WT</b>	Wild-Type. Genotipo silvestre

## RESUMEN

El estudio de los mecanismos asociados a la progresión y tratamiento del melanoma adquiere importancia en un país como el nuestro, en donde las neoplasias malignas son la tercera causa de muerte. El melanoma es el cáncer con peor pronóstico en etapas avanzadas, ya que cuando se detecta en los pacientes, poco pueden hacer las estrategias terapéuticas convencionales como la radiación y la quimioterapia. Sin embargo, la implementación de estrategias inmunoterapéuticas, como el bloqueo de receptores de inhibición de las células inmunitarias, han demostrado una mejora substancial en la expectativa de vida de los pacientes. Estas estrategias son de difícil acceso y además un alto porcentaje de pacientes presentan poco e inclusive nulo beneficio terapéutico debido a mecanismos de resistencia a inmunoterapia hasta el momento poco comprendidos.

El propósito de este trabajo fue estudiar y caracterizar los mecanismos de resistencia, mediante el desarrollo de un modelo que permitió obtener tumores sensibles o resistentes a inmunoterapia anti-PD-1 utilizando a la respuesta inmune como presión selectiva sobre las células tumorales. Además, se desarrolló un modelo in vitro el cual permitió evaluar los mecanismos de resistencia que adquieren los linfocitos T por el contacto con células tumorales.

Se encontró que los tumores sensibles a la inmunoterapia anti-PD1 se caracterizaron por un incremento en el infiltrado de células agotadas (PD-1+) con fenotipo exhausto (Tex) y precursor exhausto (Tpex) potencialmente funcionales mientras que los resistentes se caracterizaron por un bajo infiltrado de células CD8, principalmente con fenotipo Tpex. Así mismo los datos obtenidos en el modelo in vitro demostraron que el contacto con células resistentes a inmunoterapia compromete la diferenciación de los linfocitos T generando preferencialmente linfocitos T con fenotipo precursor exhausto (TexP2) con alteraciones en la proliferación y en la función esto en comparación con los linfocitos T diferenciados en contacto con células parentales de melanoma con potencial respuesta a inmunoterapia, las cuales indujeron un fenotipo exhausto intermedio (TexInt), Esta alteración en la diferenciación asociada a la proliferación y la función no pudo ser revertido en linfocitos T deficientes de PD-1, sugiriendo que este mecanismo de resistencia es independiente de la inhibición regulada por la vía PD-1/PD-L1.

Los resultados de este trabajo aportan evidencia sobre la importancia de la diferenciación a fenotipos funcionales capaces de proliferar de los linfocitos T CD8 agotados, en la resistencia a inmunoterapia. Así mismo, abre la puerta a explorar vías alternativas que reviertan estos mecanismos de resistencia y mejoren la eficiencia de la inmunoterapia en cáncer.

## ABSTRACT

Research on skin cell melanoma progression and its treatment takes relevance in our country, where cancer is the third common cause of death. Skin cell melanoma is the deadliest skin cancer and conventional treatments as radiation or chemotherapy hardly have any effect since this malignancy is diagnosed at advanced stages. However, immunotherapeutic strategies such immune checkpoint blockade (ICB) have demonstrated a substantial improvement on survival of melanoma patients. These strategies are not used routinely in our country due to its high cost that makes it unachievable for most patients, moreover a high percentage of patients treated with ICB do not present clinical benefit due to resistance to immunotherapy whose mechanisms are not fully understood.

The present work intended to identify immunotherapy resistance mechanisms through the development of a murine model that permitted the obtention of both responsive and non-responsive anti-PD1 immunotherapy tumors, using immune selective pressure against tumor cells *in vivo*. Additionally, it was established an *in vitro* model using tumor spheroids in contact with immune cells that allowed to identify preliminary immune checkpoint blockade resistance that relies on the contact between T lymphocytes and tumor cells.

Responsive tumors to anti-PD1 immunotherapy were characterized by an increase on the exhausted (PD1+) infiltrate that were similar in phenotype with terminal exhausted cells (Tex) and progenitor exhausted cells (Tpex), while non-responsive tumors were characterized by a limited infiltration of CD8 T cells mainly with a Tpex phenotype.

Furthermore, *in vitro* model exhibited that contact among ICB resistant tumor cells (R1) and immune cells, compromises proliferation and differentiation of Exhausted CD8 T cells generating particularly progenitor exhausted type 2 T cells (Tpex2) with reduced function compared with exhausted T cells in contact with parental tumor cells (MO4) which generated an intermediate exhausted T cell phenotype (TexInt). This compromise can not be reversed on PD-1 knock out T cells, suggesting this mechanism of ICB resistance occurs in a PD-1/PD-L1 independent manner.

This work offers evidence regarding the importance of correct differentiation, proliferation and function of exhausted CD8 T cell lymphocytes on ICB response, in addition this work could be used to explore further alternative treatments that overthrow ICB resistance and to improve cancer immunotherapy.

# 1. ANTECEDENTES.

## EL CÁNCER COMO PROBLEMA DE SALUD.

Según datos de la organización mundial de la salud el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, los reportes del 2020 indican que este grupo de patologías causó la muerte de alrededor de 9.96 millones de personas, de las cuales el 70% pertenecían a países en desarrollo. Se estima que el cáncer tiene un costo anual de 1.16 trillones de dólares al menos en países desarrollados donde es posible acceder a servicios de salud así como a tratamientos de última generación<sup>1</sup>. En México, el cáncer es la tercera causa de muerte en el país y se estima que en el año 2020 hubieron mas de 195 mil nuevos casos de cáncer, de los cuales cerca del 50% se traducirán en fallecimientos asociados a la neoplasia<sup>3</sup>. Se espera que en el 2025 el número de casos nuevos incremente en un 50%<sup>3</sup>. De esta manera, el acceso a servicios de salud y a tratamientos efectivos contra el cáncer son determinantes en el combate de esta enfermedad.

De entre las variantes de cáncer con mayor mortalidad en México, se encuentra el melanoma el cual es una lesión maligna asociada a la transformación de los melanocitos. Estas células son de origen neuroectodérmico y su función es producir y secretar melanina con el fin proteger el material genético del daño causado por la luz ultravioleta al cual están expuestas algunas células epiteliales como los queratinocitos.<sup>4,5</sup>

Al año se estima que hay 3000 nuevos casos de melanoma en el país lo que representa un incremento del 500% en la incidencia si se compara con datos de la década de 1960<sup>2,3</sup>. Lo anterior, en conjunto con una esperanza de vida de 5 años en sólo el 18% de los pacientes con melanoma invasivo, hace a esta neoplasia un problema de salud serio que requiere el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que mejoren la expectativa de vida en los pacientes con esta enfermedad en nuestra población.

En años recientes, el uso de anticuerpos monoclonales que bloquean señales de inhibición del sistema inmune, ha revolucionado el campo de la inmunoncología<sup>6</sup> debido a que estas estrategias terapéuticas han demostrado mejorar la expectativa de vida en pacientes con estadios avanzados de melanoma y otras neoplasias malignas<sup>7</sup>.

El melanoma es particularmente un blanco atractivo para el empleo de inmunoterapia y en general para el estudio de la respuesta inmune antitumoral, debido a su alta inmunogenicidad,<sup>8</sup> la cual se genera por la alta expresión de neoantígenos o antígenos asociados a tumor (MART1,TRP-1,TRP-2 y gp100)<sup>9</sup> por parte de las células tumorales, lo anterior asociado a la alta tasa mutacional que acumulan las células transformadas<sup>10</sup>.

## RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL

La idea de la interacción del sistema inmune con las células tumorales data de observaciones de principios del siglo XX, donde pacientes con infecciones bacterianas severas, remitían de manera espontánea tumores no tratados. Sin embargo, no es hasta 1964 que Macfarlane Burnet introduce la posibilidad de que las células tumorales puedan ser vigiladas y eliminadas por células sistema inmunológico, de manera similar al control inmune que es ejercido sobre tejidos trasplantados no histocompatibles y acuña el término de inmunovigilancia en cáncer, de la cual los mecanismos eran desconocidos en ese momento<sup>11</sup>. Esta hipótesis fue controversial desde su concepción, dado que una de las interrogantes principales sobre la misma fue el hecho que distintas neoplasias parecían ser exitosas en su establecimiento, a pesar de la hipotética inmunovigilancia que en teoría habría sobre ellas, sin embargo, cerca de 70 años de investigación exhaustiva en modelos murinos y observaciones en pacientes con cáncer, han brindado elementos suficientes para aceptar lo que una vez fue una hipótesis<sup>12,13</sup>.

Uno de estos elementos ha sido la observación de un infiltrado robusto de células inmunitarias en tumores de distintas etiologías, las cuales en algunas ocasiones resultan útiles para predecir el desenlace de los pacientes. El papel de las células inmunes infiltrantes de tumor ha tomado tal relevancia que hoy en día los tumores pueden clasificarse en calientes (*hot tumors*) o fríos (*cold tumors*)<sup>14</sup> en función del nivel de infiltrado inmune, así como el tipo de células inmunitarias infiltrantes de tumor<sup>15</sup>. Esta clasificación ha sido utilizada como referencia para predecir la respuesta a terapias antineoplásicas, donde los tumores calientes serían más responsivos que los fríos.

De manera relevante, se ha determinado que las células transformadas pueden ser reconocidas como extrañas por células del sistema inmune en función de la expresión de neo antígenos, producto de la inestabilidad genómica de las células cancerígenas, así como en función de la expresión de antígenos que no deberían ser expresados por células de su tipo, como lo pueden ser proteínas expresadas por células troncales, lo anterior como una consecuencia de la transformación y reversión fenotípica de las células tumorales.

Tal evidencia sobre el reconocimiento de las células tumorales como células extrañas por parte del sistema inmune, plantea la interrogante central sobre la inmunovigilancia en cáncer, ¿cómo evaden las células neoplásicas el control inmunitario y logran establecer tumores? Dicha pregunta se esclareció a principios de este siglo cuando surgió la teoría de la inmunoección en cáncer, la cual ha sido

comprobada en distintos tipos de cáncer como el colorrectal y el melanoma. La inmunoección en cáncer asume que el escape de las células transformadas de la inmunovigilancia se da como un proceso continuo de selección de las clonas tumorales capaces de evadir el sistema inmunitario.

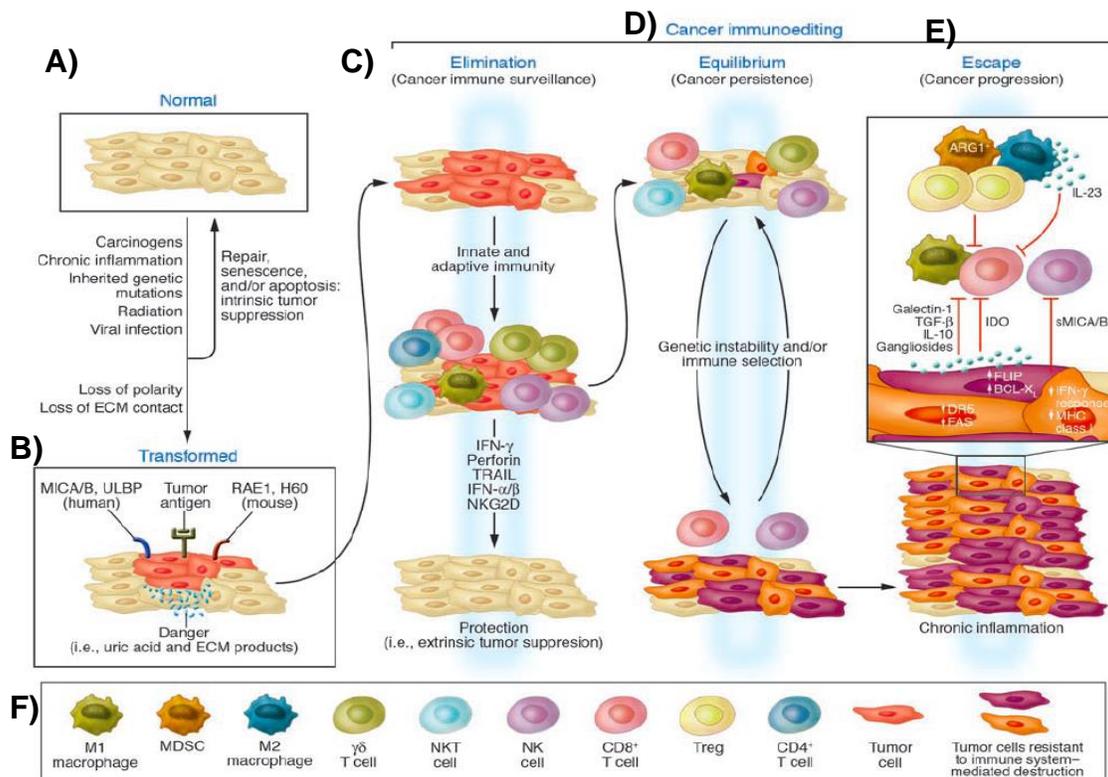
## INMUNOEDICIÓN EN CÁNCER

Dicha inmunoección establece que de manera fisiológica las células inmunitarias reconocen células transformadas y las eliminan de manera continua. Lo anterior a través del reconocimiento de células inmunes innatas de la transformación celular como las células NK, que pueden activarse y ejercer citotoxicidad por cambios en el patrón de expresión antigénica de células infectadas o transformadas. Esta eliminación innata de células tumorales también atraería a células dendríticas (DC) que pueden capturar, procesar y presentar los antígenos tumorales generados en un contexto de activación como lo pueden ser señales moleculares de daño o muerte, estas DCs migrarían al ganglio linfático más cercano con el fin de activar y diferenciar a linfocitos T CD4 y CD8 los cuales egresarían del LN e infiltrarían los tumores y retroalimentarían el control inmunitario antitumoral<sup>16</sup>. (**Figura 1A y 1B**)

Sin embargo, esta eliminación (**Figura 1C y 1D**) también puede generar una presión selectiva del sistema inmune sobre las células transformadas que va editando de manera aleatoria a las células tumorales para adquirir de manera paulatina mecanismos de evasión inmunitaria, tales como cambios en la expresión antigénica que resulta en la evasión de células específicas como linfocitos T CD8 y CD4, así como la expresión de moléculas regulatorias que normalmente sirven para atenuar la sobre activación de las células inmunitarias, conocidos como *receptores inmunes de control*, tal es el caso del ligando de PD-1 (PD-L1), ligandos de LAG3, TIM3 o CTLA4, así como moléculas solubles con actividad inmunosupresora como TGF $\beta$  o IL-10 las cuales inhiben la actividad de las células inmunitarias antitumorales. Esta supresión de la actividad inmunitaria también se ve acompañada por el reclutamiento de células inmunitarias con actividad regulatoria como las células T reguladoras (Treg) que bajo los diversos mecanismos de supresión que poseen, pueden inhibir las células inmunitarias antitumorales así como células mieloides supresoras. De igual forma se ha descrito que uno de los mecanismos de evasión inmune que desarrollan las células tumorales consiste en la inducción de un microambiente inflamatorio que contrarresta el perfil inflamatorio adecuado para el combate antitumoral como lo es el reclutamiento de células Th2 secretoras de IL-4 que compromete la diferenciación hacia un perfil Th1 y la correcta activación de células T CD8 citotóxicas<sup>17</sup>. De igual forma el perfil Th2 favorece la expresión de citocinas con función reparatoria de tejido por parte de macrófagos conocidos como

M2, así mismo el perfil Th2 induce un fenotipo de células dendríticas maduras con función regulatoria que comprometen la correcta activación de linfocitos T<sup>18</sup>. Estos mecanismos de evasión se darían en un momento de la inmunoección llamado fase de equilibrio (**Figura 1D**) en la que las células inmunes sobrellevan cada uno de los mecanismos de evasión desarrollados hasta que se acumulan por la presión selectiva y las células tumorales por el conjunto de mecanismos de evasión acumulados son capaces de escapar del control inmunitario y crecen sin control, entrando a la fase final de la inmunoección en cáncer conocido como escape<sup>19</sup>. Cabe señalar que la etiología tumoral es determinante para el establecimiento de los diversos mecanismos de evasión inmunitaria desarrollados y es en sí uno de los motivos por los que hay neoplasias caracterizadas por tumores calientes y otras por tumores fríos. La **Figura 1** ilustra en buena manera el proceso de inmunoección en cáncer

Lo anterior ha llevado a una nueva era en el tratamiento del cáncer con medicina de precisión, que toma en cuenta la heterogeneidad etiológica de los tumores e inclusive la heterogeneidad entre pacientes tanto a nivel molecular como a nivel fenotípico de las células inmunitarias infiltrantes de tumor. De igual forma, el estudio de la interacción de las células del sistema inmunitario con células tumorales ha llevado a la búsqueda y desarrollo de novedosas estrategias terapéuticas basadas en la reversión de los mecanismos de evasión inmune desarrollados por las células tumorales.



**Figura 1. Inmunoedición en cáncer. (Modificado de Swann J. y Smyth M. , JCL, 2007).** A) la inmunoedición de las células cancerígenas se da desde las etapas tempranas de la carcinogénesis en la que las células transformadas a través de distintos mecanismos, B) liberan señales de daño así como antígenos asociados, que en conjunto con la proliferación descontrolada C) activan células innatas del sistema inmune que las eliminan y al mismo tiempo montan una respuesta de memoria a través de la activación de linfocitos T CD4 y CD8 los cuales expresan moléculas con actividad antitumoral como IFN- $\gamma$  y citotóxica como Granzimas y perforinas. D) sin embargo, esta eliminación entra en un estado de equilibrio debido a la persistencia de clones tumorales con distintos mecanismos de evasión inmune que las van seleccionando como las más aptas y, por lo tanto, E) escapan del sistema inmunitario y crecen sin control alguno. F) Las células mieloides como macrófagos (M1 o M2), células mieloides supresoras y DCs en conjunto con células linfoides como linfocitos T CD4, CD8 y células NK juegan un papel importante en la inmunoedición sobre las células tumorales y son determinantes en el desenlace de las neoplasias malignas

## LA INMUNOTERAPIA

*La inmunoterapia y su estrecha relación con el melanoma.*

Al conjunto de estrategias dirigidas a la modulación, tanto positiva como negativa del sistema inmune, se le ha denominado inmunoterapia. Su efectividad en el tratamiento de tumores con mal pronóstico como el melanoma avanzado, le ha merecido el título de descubrimiento del año (2013) por la revista Science<sup>15</sup>. En 2011 la FDA aprobó el uso de Ipilimumab (un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4) en pacientes con melanoma avanzado y a partir de este hecho, la búsqueda de nuevos blancos inmunoterapéuticos ha crecido de manera exponencial<sup>15</sup>. Posterior a Ipilimumab, también se aprobó el uso de anti-PD-1 en pacientes con melanoma avanzado. El éxito de ambas monoterapias llevó a plantear el uso combinado de estas, observándose incremento en el porcentaje de pacientes responsivos a inmunoterapia<sup>20</sup>.

Gracias a la propuesta del empleo de anticuerpos que bloquean estas moléculas inmunoreguladoras, James P. Allison y Tasuku Honjo fueron acreedores al premio Nobel en Fisiología o Medicina en 2018. Al día de hoy el uso de estos anticuerpos no se limita a pacientes con melanoma avanzado, sino que han sido aprobados para una gran variedad de tumores tanto para su uso individual como combinado<sup>15</sup>.

A pesar del gran éxito que ha tenido la inmunoterapia en el tratamiento contra el cáncer, no todos los pacientes tratados han demostrado algún beneficio clínico. Lo anterior tanto para las monoterapias como para la terapia combinada. Los ensayos clínicos completados en melanoma indican que el bloqueo de CTLA-4 tiene un beneficio menor al 20% en los pacientes con melanoma avanzado, con un pequeño número de pacientes que permanecen libres de tumor después de 6 años del tratamiento. Los anticuerpos anti-PD-1 muestran una respuesta de aproximadamente 30% con menos efectos colaterales que con el tratamiento con

anti-CTLA-4. De manera notable, el bloqueo en conjunto de CTLA-4 y PD-1 ha demostrado beneficio clínico en el 61% de los pacientes, mejorando por mucho lo observado en la terapia sencilla. Sin embargo, aún con la combinación, el 39% de los pacientes no mostraron algún beneficio clínico, indicando que poseen resistencia intrínseca a la inmunoterapia, además que el 27% de los pacientes que inicialmente respondieron recayeron, indicando que adquirieron resistencia a inmunoterapia<sup>21</sup>.

## MECANISMOS DE LOS BLANCOS DE INMUNOTERAPIA ANTI-CTLA-4 Y ANTI-PD-1

La búsqueda de los mecanismos que llevan a los pacientes a desarrollar resistencia (intrínseca o adquirida) a la inmunoterapia ha recuperado el interés por el estudio de la interacción del sistema inmunológico con las células tumorales<sup>15</sup> y supone uno de los retos más grandes en esta área de investigación<sup>22</sup>. El estudio de la resistencia al bloqueo de receptores de inhibición (ICB) depende del entendimiento de los mecanismos de acción de las moléculas blanco de la inmunoterapia. En este, sentido hasta el momento es poco claro cuáles son las células blanco de los anticuerpos anti-CTLA-4 y anti-PD-1. Así mismo, no es muy bien entendido cuál es el efecto del bloqueo de estos receptores en el contexto tumoral<sup>22</sup>.

En un principio la descripción de los mecanismos fisiológicos por los cuales tanto CTLA-4 como PD-1 regulan la activación de los linfocitos T sirvió como sustento para explicar lo que sucedía en el contexto tumoral, sin embargo, estudios tanto clínicos como preclínicos indican que existen mecanismos alternos por los cuales la inmunoterapia ejerce su acción antitumoral<sup>23</sup>. Bajo condiciones normales, los receptores de inhibición CTLA-4 y PD-1 tienen la función de regular la activación de los linfocitos T con el fin de evitar que se desarrolle una respuesta inmune exacerbada y en consecuencia patologías inflamatorias o autoinmunes. La regulación por CTLA-4 y PD-1 no es redundante, ya que se ejerce en sitios anatómicos distintos y en momentos distintos de la activación del linfocito T, por lo tanto, dicha regulación es espaciotemporal<sup>22</sup>.

CTLA-4 es expresado en el linfocito T después de su activación por una célula presentadora de antígeno profesional (APC) y compite con CD28, una molécula de coestimulación clave en la activación correcta de los linfocitos T vírgenes. Esto debido a que ambos tienen alta afinidad por moléculas de la familia B7 como CD80 y CD86. Sin embargo, CTLA-4 es más afín por estos ligandos y su interacción inhibe

las señales generadas por la interacción CD28-B7. Esta inhibición de la señalización de CD28 modula a la baja los eventos tempranos de la activación del TCR así como la activación de la vía de Akt<sup>20,22,24</sup>. Dado que CTLA-4 ejerce una regulación importante en la activación inicial de los linfocitos T y esta activación se da normalmente en tejidos linfoides secundarios como los nódulos linfáticos, se piensa que su bloqueo en estrategias inmunoterapéuticas influye en el repertorio de linfocitos T específicos que se generan en contra de antígenos tumorales, como puede ser el caso de inmunoterapia anti CTLA-4 en melanoma<sup>25</sup>. De manera importante también se ha sugerido que, el mecanismo por el cual CTLA-4 mejora la respuesta inmune antitumoral es mediante la eliminación selectiva de linfocitos T reguladores (Treg) debido a que estas células expresan CTLA-4 de manera constitutiva y requieren de la interacción con sus ligandos para su supervivencia, de tal forma que si esta interacción se bloquea con anticuerpos anti CTLA-4, la supervivencia de los Treg se vería comprometida<sup>25</sup>. Estos linfocitos Treg infiltran de manera relevante diversos tumores, en donde cumplen con un papel inmunosupresor y, por lo tanto, favorecen la evasión del sistema inmunológico<sup>26</sup>.

Evidencia reciente indica que anti-CTLA-4 también favorece la expansión y probablemente la diferenciación de una población atípica de linfocitos Th1 ICOS+ la cual asemeja en muchos marcadores a las células Th foliculares<sup>23</sup>, lo cual resulta relevante si se considera que la presencia de estructuras linfoides terciarias en los tumores, se ha asociado con un buen pronóstico. Sin embargo, sería importante determinar si esta población atípica de linfocitos Th1 se genera por el bloqueo de CTLA-4 o si el microambiente tumoral es quien la genera y dicho bloqueo la rescata y expande<sup>25</sup>.

PD-1 al igual que CTLA-4 se expresa derivado de la interacción TCR/pMHC entre un linfocito T con una célula presentadora de antígeno profesional (APC). De hecho, es la señalización del TCR la que induce la expresión de esta molécula de inhibición. Así mismo, los ligandos de PD-1 son homólogos en estructura y secuencia a las moléculas B7, por eso se les conoce como B7-H. Existen dos ligandos para PD-1: PD-L1 y PD-L2, ambos expresados por APCs como las células dendríticas.

A diferencia de CD80/CD86, el ligando de PD-1 (PD-L1) puede ser expresado por otras células no inmunes como las epiteliales<sup>22,23</sup>. Este eje de regulación se ha demostrado que es importante en el mantenimiento de la tolerancia periférica y en la regulación y mantenimiento de una respuesta inflamatoria controlada en tejidos no linfoides<sup>27</sup>.

De igual forma, se ha descrito que la expresión de PD-L1 se rige por la estimulación del receptor de interferón gamma (IFN $\gamma$ ), una citocina secretada por las células

inmunes, en respuesta a patógenos intracelulares como virus y bacterias. Esta molécula es característica del perfil Th1 de linfocitos T CD4+ así como de linfocitos T CD8 citotóxicos. Ambos determinantes en la respuesta inmune antitumoral.

La atenuación de la activación del linfocito T mediante PD-1 se da porque la señalización de esta molécula está implicada directamente con los eventos proximales en la activación del TCR, esto a través de la activación de la fosfatasa SHP2, la cual inhibe directamente la fosforilación de LCK y con ello su actividad sobre ZAP70 y PI3K, dos señales involucradas en la proliferación y activación de los linfocitos T. Sumado a esto existe evidencia que indica que el principal blanco de la regulación mediada por PD-1 es la cascada de señalización de CD28, a través de la regulación directa de SHP2 sobre intermediarios de la vía de señalización de CD28<sup>7</sup>.

Debido a que PD-L1 se expresa en altas proporciones en las células tumorales y que la expresión intermedia de PD-1 es una característica de los linfocitos T efectoras, en un principio se pensó que el bloqueo de la vía PD-1/PD-L1 en inmunoterapia abatía la inhibición generada por las células tumorales en los linfocitos T infiltrantes con actividad citotóxica<sup>23,28</sup>.

Sumado a lo anterior, los modelos preclínicos en ratón y los ensayos clínicos han demostrado que la funcionalidad de los linfocitos infiltrantes de tumor está comprometida, asemejando a un estado en un principio denominado como disfuncional y hoy ampliamente reconocido como agotamiento de linfocitos T, del cual se han descrito diversos fenotipos y estadios funcionales que serán descritos más adelante. Interesantemente, se ha observado recientemente que la inmunoterapia anti-PD-1 incide en algunos de los fenotipos de agotamiento de los linfocitos T, predominantemente los linfocitos T CD8 citotóxicos sugiriendo que el uso de anticuerpos inmunoterapéuticos puede aliviar el estado de agotamiento de los linfocitos infiltrantes de tumor y con ello recuperar su función para combatir las células tumorales<sup>6,25,29</sup>.

## AGOTAMIENTO DE LINFOCITOS T

El agotamiento, o también denominado estado exhausto de los linfocitos T es un estadio de diferenciación de los linfocitos T que impacta a nivel fenotípico y funcional, el cual normalmente se deriva de la estimulación antigénica crónica y posiblemente de la afinidad del TCR a los péptidos antigénicos presentados.<sup>30</sup> Estos linfocitos agotados se caracterizan por un compromiso en su funcionalidad, como lo

es la disminución en la expresión de moléculas efectoras y en la elevada expresión de receptores de inhibición como PD-1<sup>29</sup>. Esto ha sido estudiado a profundidad en infecciones virales crónicas como la causada por el virus de la hepatitis B o C en humanos o el virus de la coriomeningitis crónica (LCMV) en ratones. De igual forma, se sabe que en los tumores, tanto obtenidos de modelos murinos como de biopsias de pacientes, presentan un elevado infiltrado de linfocitos con fenotipo agotado<sup>29,31</sup>.

Los linfocitos T agotados fueron denominados en un principio “disfuncionales”, dado que en comparación con células T efectoras diferenciadas en un contexto de estimulación antigénica aguda. Presentan una limitada función como la expresión de citocinas o capacidad citotóxica, así como una proliferación comprometida que se acompaña por una alta expresión de receptores de inhibición como PD-1 los cuales están en constante contacto con sus ligandos. Sin embargo, el conocimiento actual ha logrado discernir que el agotamiento de linfocitos T no es equivalente a una disfunción completa de estos linfocitos, si no una atenuación de la capacidad efectora de estas células, la cual en el contexto de infecciones crónicas pudiera servir para evitar cuadros de inflamación crónica.

En otras palabras, el agotamiento de los linfocitos T pudiera representar un proceso alterno de diferenciación de estas células en condiciones crónicas de estimulación antigénica, análogo a los mecanismos de diferenciación de células T en condiciones de estimulación aguda, dicho proceso se caracterizaría por la pérdida progresiva de la función y proliferación de los linfocitos T, probablemente como un mecanismo de autolimitación de la actividad inmunitaria de estas células.

En el contexto tumoral también se han identificado linfocitos T CD8 agotados, los cuales no pueden ejercer su papel en la inmunovigilancia en cáncer debido a la atenuación de su actividad citotóxica y la disminución en la expresión de citocinas antitumorales como IFN $\gamma$  y TNF.<sup>32</sup>

La caracterización del estado de agotamiento de los linfocitos T ha mejorado el entendimiento de los mecanismos de acción de los anticuerpos inmunoterapéuticos ya que se ha observado que tanto en pacientes tratados con inmunoterapia así como en modelos murinos, el uso de anti-PD-1 no sólo rescata la función de los linfocitos T efectores inducido por las células tumorales, sino que también el bloqueo de PD-1 impacta en el estado de agotamiento de los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) los cuales puede recuperar su capacidad de proliferación y la expresión de citocinas con actividad antitumoral como IFN $\gamma$ .<sup>33,34</sup>

El estudio del agotamiento en modelos murinos ha servido para profundizar en los mecanismos responsables de la respuesta a inmunoterapia tanto en infecciones

virales crónicas como en modelos tumorales, debido a la presencia de subtipos de linfocitos T con fenotipo de agotamiento. Estos trabajos identificaron en un principio 2 grandes subtipos de linfocitos T CD8 agotados, los cuales difieren en su funcionalidad que deriva en diferencias en los patrones de expresión de receptores inhibitorios, moléculas efectoras, capacidad de proliferación y en la expresión de factores de transcripción<sup>29,34</sup>. Sin embargo, recientemente la descripción de los subtipos de poblaciones de linfocitos T agotados ha dilucidado 4 fenotipos en función de la expresión de TCF1 y CD69, ambos marcadores han sido de utilidad en la descripción del estadio progenitor de las células T (TFC1) y la función y estado de activación (CD69) por lo que en conjunto con PD-1 como marcador de agotamiento han ayudado a resolver el complejo espectro fenotípico y funcional encontrado en las células T agotadas.<sup>35</sup>.

El primero es un factor de transcripción río abajo de la vía de señalización de WNT, y cumple con un rol importante en el desarrollo de los linfocitos T, particularmente en el linaje citotóxico, funge como regulador de la proliferación y autorenovación de las células T de memoria. CD69, por otra parte, es una lectina tipo C expresada en linfocitos activados, que cumple como represor del receptor de esfingosina 1 fosfato y permite el egreso de las células T de tejidos linfoides secundarios. Así mismo CD69 es un marcador de células efectoras residentes de tejido y su expresión en tejidos periféricos se relaciona con fenotipos efectores de linfocitos T.

### *Subtipos de Linfocitos T agotados*

La descripción de los fenotipos de agotamiento ha permitido entender en gran medida los mecanismos de acción de la inmunoterapia. Un primer subtipo de linfocitos T agotados descritos son los denominados “Progenitores Exhaustos” (Tpex), los cuales reciben este nombre por su alta expresión de TCF1<sup>36</sup>. La evidencia indica que estos Tpex retienen capacidad de auto renovación y, por lo tanto, son los responsables de mantener la respuesta inmune adaptativa a largo plazo. Por otra parte, han recibido el nombre de progenitores, ya que diversos ensayos han demostrado que son los responsables de generar a los linfocitos T “terminalmente exhaustos” los cuales se describen más adelante.

Estudios transcriptómicos han determinado que los Tpex comparten similitud con el fenotipo de memoria central (expresión de CCR7+ y CD44+) pero se diferencian en la expresión de moléculas de inhibición como PD-1. Estos estudios señalan también que los linfocitos Tpex expresan marcadores asociados a linfocitos foliculares como CXCR5, ICOS y BCL6, lo cual sugiere que la presencia de este fenotipo depende de la interacción con células que normalmente se encuentran en los folículos de los tejidos linfoides como las células T CD4 foliculares o linfocitos B<sup>33</sup>. Se ha

demostrado además que estos linfocitos progenitores exhaustos no tienen una capacidad efectora y que su función es la auto renovación y la generación de linfocitos T terminalmente exhaustos (Tex)<sup>34</sup>.

Los linfocitos Tex se caracterizan por una alta expresión de moléculas de inhibición, entre ellas TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1 así como CTLA-4; Estos linfocitos T exhaustos, contrario a lo que se había propuesto décadas atrás<sup>29</sup>, retienen capacidad efectora debido a que se ha demostrado que pueden expresar moléculas asociadas a su función citotóxica como granzima B y Perforinas así como IFN $\gamma$ <sup>6</sup>. Sin embargo, cabe señalar que dicha expresión es menor si se compara con linfocitos T efectores. En comparación con el subtipo Tpex los linfocitos Tex expresan en mayor cantidad moléculas efectoras (granzima B e IFN) <sup>32</sup>; de modo que se considera a este fenotipo como el efector en el contexto de agotamiento y ,por lo tanto, la población que potencialmente es rescatada con los ICB. Como se mencionó, los Tex son generados a partir de Tpex y no viceversa. En consecuencia, el mantenimiento de los linfocitos Tex en patologías crónicas depende de la diferenciación y mantenimiento de los linfocitos Tpex, por lo que la presencia de esta población, a pesar de no tener una capacidad funcional, pudiera ser determinante en la respuesta a los ICB.

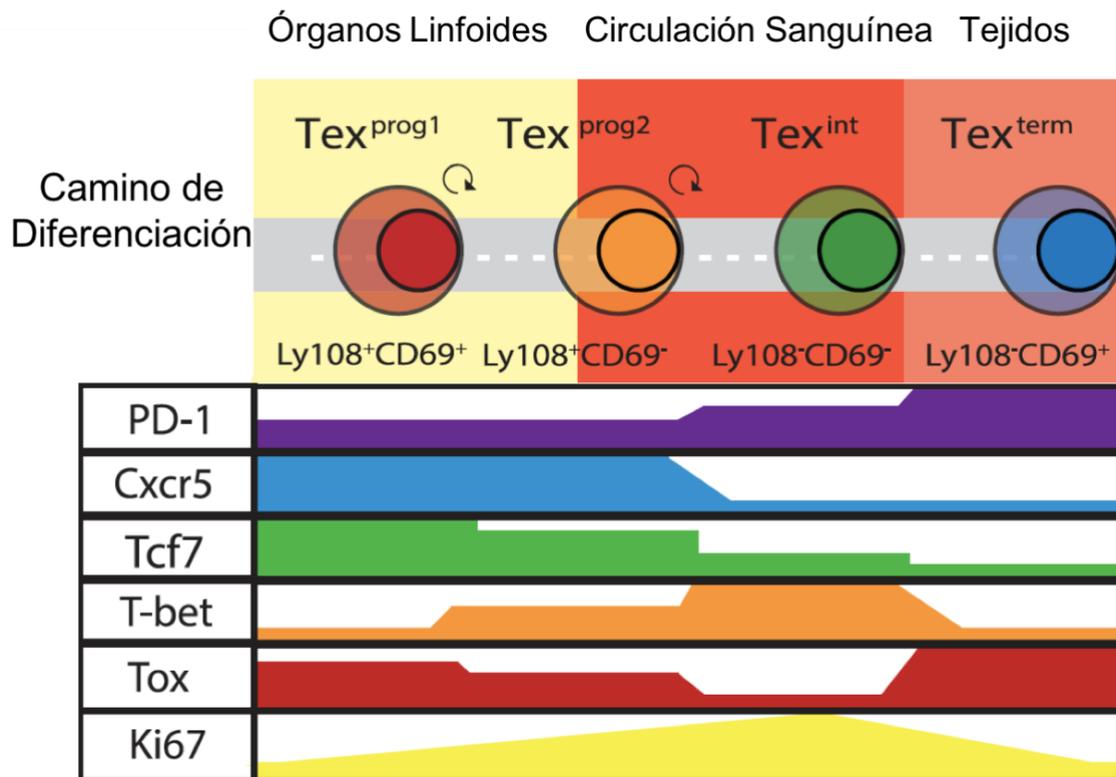
Por otro lado, en un trabajo reciente realizado por Beltra<sup>35</sup> y colaboradores, se demostró que utilizando la expresión de TCF1 y CD69 pueden caracterizarse al menos 4 poblaciones de linfocitos T agotados, las cuales representan estadios de diferenciación y función. Es así que las células agotadas pueden clasificarse como células exhaustas precursoras tipo I (Tpex1 ó Tex<sup>prog1</sup>), caracterizadas por la expresión de TCF1, CD69 y TOX (un factor de transcripción normalmente asociado a la activación de la vía de NFAT derivada de la señalización del TCR). Estas células Tpex1 dan lugar a los demás fenotipos de agotamiento, retienen una alta expresión de moléculas efectoras como granzima B e IFN $\gamma$ . Esta población se encuentra principalmente en tejidos linfoides secundarios y dan lugar a las células precursoras tipo 2 (Tpex2 ó Tex<sup>prog2</sup>).

Las células Tpex2 son circulantes y se establecen en los tejidos periféricos, se caracterizan por la expresión de TCF1 y nula expresión de CD69 y retienen capacidad proliferativa, aunque de manera importante pierden capacidad efectora.

Las células Tpex2 dan lugar a células exhaustas con un fenotipo intermedio entre las precursoras y las terminales (TexInt), estas células se encuentran principalmente en los tejidos periféricos de donde proviene el estímulo antigénico (Tumor o sitio de infección crónica), no expresan TCF1, CD69 o TOX, pero retienen capacidad proliferativa y nuevamente expresan moléculas efectoras asociadas a la actividad del factor de transcripción T-bet como IFN $\gamma$ , estas células dan lugar a las células exhaustas terminales (TexTerm).

Las células TexTerm recuperan la expresión de CD69 y TOX y pierden la expresión de T-bet, estas células pierden la capacidad proliferativa y se consideran como terminales debido a su alta expresión de marcadores apoptóticos como Caspasa 3 activa, sin embargo, dichas células mantienen la capacidad de expresión de moléculas efectoras como granzima B, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ . Este fenotipo es comparable al previamente descrito como linfocitos T agotados o exhaustos<sup>34</sup>. Cada uno de los fenotipos de los linfocitos T agotados pueden entenderse como un estadio en el camino de diferenciación hacia el agotamiento terminal, tal y como se ilustra en la **Figura 2**.

Es importante mencionar que en el trabajo en donde se describen los subtipos de agotamiento no se identifica cuál de estos fenotipos es determinante a la respuesta a inmunoterapia y cuál se podría asociar con la resistencia. En este sentido, algunos trabajos han demostrado que el bloqueo de PD-1 impacta de manera positiva en la proliferación y diferenciación del fenotipo Tpex, sin embargo, no es claro hasta el momento el impacto de dicho bloqueo en los demás fenotipos de células T agotadas. Diversos autores han sugerido que la inmunoterapia actúa principalmente sobre las células precursoras (Tpex1 o Tpex2), induciendo rondas proliferación y diferenciación que pueden conllevar a un incremento en la cantidad de células efectoras exhaustas con capacidad de ejercer citotoxicidad en contra de las células tumorales<sup>34,37</sup>.



**Figura 2. Camino de diferenciación de los linfocitos T agotados (Modificado de Chu y Colaboradores. , Immunity, 2020)<sup>38</sup> .** El agotamiento de los linfocitos T puede entenderse como una pérdida progresiva de su función o un camino de diferenciación característico de la estimulación crónica en patologías como el cáncer. Dicho camino iniciaría con la generación de células Tex<sup>prog1</sup> o T<sup>pex1</sup> con alta capacidad de proliferación, expresión de CD69, TCF1 (gen TCF7) así como PD-1 moderado, CXCR5, TOX alto y SLAMF7 (Ly108). Las T<sup>pex1</sup> dan lugar a las células Tex<sup>prog2</sup> o T<sup>pex2</sup> caracterizadas por la expresión de TCF1, SLAMF7, PD-1 moderado, CXCR5, TOX moderado y Ki67 moderado. Las T<sup>pex2</sup> dan lugar a las células Tex<sup>int</sup> caracterizadas por la expresión de T-bet, PD-1 alto y Ki67 alto. Las Tex<sup>int</sup> dan lugar a células terminales Tex<sup>Term</sup> caracterizadas por la expresión de CD69, PD-1 alto y TOX alto. Además de los marcadores fenotípicos, los subtipos de células agotadas se encuentran localizadas de manera diferencial en tejidos linfoides secundarios, circulación sanguínea y tejidos periféricos, tal y como se observa en los distintos subtipos de memoria generada por los linfocitos T.

## EL AGOTAMIENTO Y SU RELACIÓN CON LA RESPUESTA A INMUNOTERAPIA

En relación con la respuesta a la inmunoterapia, la caracterización del estado agotado de los linfocitos T CD8 infiltrantes de tumor ha sugerido que la abundancia diferencial de los fenotipos de agotamiento pudiera explicar la heterogeneidad de la respuesta a inmunoterapia.<sup>6</sup> Correlaciones clínicas y datos de modelos murinos apuntan a que la presencia de linfocitos T CD8 con fenotipo T<sub>pex</sub> correlaciona de manera positiva con la respuesta a inmunoterapia<sup>32</sup>. Sin embargo, no es claro como se relaciona el estado de agotamiento de dichas células con la resistencia a inmunoterapia.

De esta manera, la descripción detallada de las distintas poblaciones de linfocitos T agotados ha llevado a proponer combinaciones terapéuticas que mejoren la funcionalidad de los linfocitos agotados, como lo es la inhibición de CD39 en conjunto con la inhibición de PD-1. Cabe señalar que CD39 es una ectonucleotidasa que cataliza la conversión de ATP extracelular a AMP, el cual posteriormente es convertido a adenosina por CD73. Ambas ectonucleotidasas son altamente expresadas en los linfocitos T<sub>ex</sub> y los productos metabólicos de estas enzimas tienen un papel importante en la supresión de estas células agotadas, por lo que el bloqueo de estas enzimas puede ser de utilidad para recuperar la función efectora de los T<sub>ex</sub><sup>39</sup>.

Dada la relevancia de los linfocitos T agotados con fenotipo precursor en la respuesta positiva a inmunoterapia, resulta determinante dilucidar los mecanismos asociados a la presencia de esta población en el microambiente tumoral. Esto representa un gran reto, ya que se sabe que a medida que incrementa la exposición antigénica mediante la señalización por TCR, incrementa la diferenciación hacia linfocitos T con fenotipo terminal, dejando a un lado la capacidad de auto renovación de los linfocitos T<sub>pex</sub>. Lo cual podría explicar la razón por la que en estadios avanzados de las neoplasias la abundancia de T<sub>pex</sub> es relativamente baja<sup>20,32</sup>. Lo anterior es relevante si se considera que el uso de ICBs está aprobado en su mayoría en estadios avanzados de dichas patologías. De tal forma que la presencia de linfocitos T agotados con fenotipo precursor en el infiltrado tumoral pudiera ser relevante en el pronóstico de respuesta a inmunoterapia.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de los factores asociados a la respuesta a inmunoterapia depende estrechamente de la generación de modelos experimentales *in vitro* o *in vivo* que permitan la generación de líneas celulares no responsivas a inmunoterapia que generen tumores resistentes; en los cuales el estudio del infiltrado tumoral, sobre todo el de los linfocitos T agotados, pueda brindar información sobre los mecanismos asociados a la resistencia o sensibilidad a inmunoterapia. Sin embargo, estos modelos no han podido desarrollarse hasta el momento debido a la falta de estrategias que puedan recapitular la heterogeneidad fenotípica de las células inmunes, así como de las células tumorales, que se observa en los pacientes responsivos o resistentes a inmunoterapia con inhibidores de puntos de control.

Antecedentes de nuestra unidad de investigación, indican que la inmunización terapéutica de péptidos del antígeno modelo ovoalbúmina (OVA) en conjunto con porinas de bacterias Gram negativas como adyuvante, en ratones previamente implantados con células de melanoma que expresan OVA; Se observa una heterogeneidad fenotípica en las células infiltrantes de tumor no mostrada en ratones no inmunizados, la cual además sugiere ser relevante en la respuesta a inmunoterapia anti PD-1. Particularmente se observó que la inmunización induce un infiltrado de células T CD8 residentes de tejido, con fenotipo agotado progenitor (Tpex) así como células T CD8 agotadas funcionales caracterizadas por la expresión de TIM3 y TCF1<sup>40</sup>. Dicha heterogeneidad fenotípica sugiere ser útil para ejercer presión selectiva sobre las células tumorales para desarrollar nuevos mecanismos de evasión inmunitaria que desencadenen en mecanismos de resistencia a inmunoterapia.

Así mismo, en nuestro grupo de investigación se ha adoptado el uso de cultivos tridimensionales *in vitro* (Esferoides) con el fin de estudiar características tumorales y su relación con la severidad de neoplasias como el cáncer de mama. Pero no se han usado estas estructuras con el fin de estudiar los mecanismos involucrados en la resistencia a inmunoterapia en células tumorales de melanoma.

De tal forma que, estos antecedentes llevan a plantear que el uso de la presión inmune ejercida por la inmunización terapéutica, en ratones previamente implantados con células de melanoma, generará una heterogeneidad fenotípica de las células tumorales sometidas a dicha presión inmunitaria, que podría ser significativa en la respuesta a inmunoterapia con inhibidores de puntos de control y que este modelo permitiría evaluar los mecanismos de resistencia a la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control.

## 2. HIPÓTESIS.

El fenotipo de las células T CD8 agotadas se relacionará directamente con la resistencia a inmunoterapia anti-PD1.

## 3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Cómo se relaciona el fenotipo de las células T CD8 agotadas con la resistencia a la inmunoterapia en un modelo murino de melanoma?

## 4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el fenotipo y función de agotamiento de las células T CD8 implicadas en la resistencia a inmunoterapia con anti-PD1 en un modelo murino de melanoma

### 4.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Evaluar el fenotipo de las células infiltrantes en tumores que respondan o no a inmunoterapia anti-PD-1
- Obtener células de melanoma a partir de tumores resistentes a inmunoterapia anti-PD-1 en un modelo murino
- Desarrollar un modelo in vitro que permita caracterizar los mecanismos asociados a la resistencia a inmunoterapia anti-PD1.
- Determinar el fenotipo de agotamiento asociado a la resistencia a inmunoterapia en células T deficientes de PD-1

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 RATONES

Se utilizaron ratones C57BL/6 WT, CD45.1 OTI o CD45.1 OTI PD-1<sup>-/-</sup>, machos de 8 a 12 semanas, libres de parásitos y patógenos alimentados con “LabDiet 5010 Autoclavable Rodent diet” (LabDiet, Estados Unidos) y agua *ad libitum*. Los ratones C57BL/6 WT fueron provistos por el bioterio de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la Facultad de Medicina U.N.A.M. del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”. Los ratones C57BL6 CD45.1 OTI y los CD45.1 OTI PD-1<sup>-/-</sup> fueron amablemente donados por la Dra. Florencia Rosetti Sciutto y el Dr. José Carlos Crispín Acuña, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Todos los experimentos fueron conducidos en concordancia con el Comité local de investigación en salud (Protocolo 3601) y fueron aprobados por el comité de ética animal de la facultad de medicina U.N.A.M. Siguiendo la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999) “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

### 5.2 CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares de melanoma B16-F10-OVA (MO4) (SCC420 Merck Millipore), B16-F0-GFP generada en nuestro laboratorio, así como los cultivos primarios de tumores resistentes a inmunoterapia fueron cultivadas con medio DMEM (Biowest), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 0.1% penicilina/estreptomina(Biowest),0.2% l-glutamina (Biowest), 0.05% β-mercaptoetanol, 0.01% Piruvato de Sodio (Biowest), 0.1% HEPES (Biowest) y 0.1% aminoácidos no esenciales (Biowest) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>

### 5.3 OBTENCIÓN DE TUMORES SENSIBLES Y RESISTENTES A INMUNOTERAPIA.

Se implantaron 2.5x10<sup>5</sup> células MO4 vía intradérmica en el flanco derecho del lomo de ratones C57BL6. Transcurridos 7 días se inmunizó vía intradérmica 30μg del antígeno modelo ovoalbúmina (OVA) en conjunto con 10μg de las porinas Omp-C y Omp-F de *S. Typhi* ATCC 9993 provistas por el Dr. Constantino López, UIMIQ. Inyecciones s.c del vehículo (PBS) fueron utilizadas como control. Posteriormente al día 19, 21 y 23 se administró vía i.p 100μg del anticuerpo monoclonal anti-PD-1 (Biolegend, Clona RPM1-14) en los grupos inmunizados.

Se evaluó cada tercer día el crecimiento tumoral hasta el día 26 o hasta que el tumor alcanzara un tamaño superior al recomendado por el comité de bioética. Midiendo el ancho y el largo de los tumores, calculando el volumen en mm<sup>3</sup> como  $4/3\pi(1/2$

ancho)<sup>2</sup>(1/2 Largo). Los tumores que no presentaron disminución o mantenimiento del volumen tumoral durante la inmunoterapia fueron considerados resistentes y los que si presentaron fueron considerados sensibles.

#### 5.4 OBTENCIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE TUMORES RESISTENTES A INMUNOTERAPIA.

Una vez clasificados los tumores como sensibles o resistentes a inmunoterapia en función del crecimiento tumoral, los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de los tumores para la obtención de suspensiones celulares o para cortes histológicos. Los tumores fueron separados de la piel utilizando tijeras y seccionados en pequeñas porciones e incubados durante 1 h con 400 U/mL de Colagenasa D (Roche) y 5µg/mL de DNAsa (Roche) en una solución de Hank's suplementada con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (Gibco), posteriormente la reacción enzimática fue detenida con 0.5 µM EDTA y la suspensión celular obtenida fue pasada por un filtro de 70µm e incubada durante 5 minutos con 0.125 mg/mL de DNAsa a 4°C. Las células fueron puestas de nuevo en suspensión en Percoll al 40% (GE healthcare) y se les agregó Percoll 90% al fondo del tubo y se centrifugaron durante 30 minutos. Las células tumorales fueron recolectadas del fondo del tubo y puestas en cultivo como se menciona en 5.2

#### 5.5 OBTENCIÓN DE CÉLULAS LINFOIDES DE TEJIDOS LINFOIDES SECUNDARIOS.

Para la obtención de Linfocitos OTI se obtuvieron ganglios maxilares, axilares, inguinales, poplíteos y bazos de ratones C57BL6, CD45.1 OTI PD1<sup>wt/wt</sup> o PD1<sup>-/-</sup> en medio RMPI (Biowest). Los ganglios linfáticos fueron disgregados en medio con Liberasa (25µg/mL) y DNAsa (0.125 mg/mL), durante 25 min a 37°C. Transcurrido este tiempo se detuvo la reacción con EDTA 0.5 M, a continuación, se filtró la suspensión celular a través de una malla de organza. Finalmente, las células re-suspendidas en medio de cultivo R-10. Los bazos fueron macerados en PBS mecánicamente, la solución celular obtenida fue incubada con Buffer de lisis RBC (Biolegend) durante 5 minutos a 4°C y agitación constante. Transcurrido el tiempo la lisis se detuvo con PBS y la suspensión fue centrifugada a 1500 rpm durante 5 minutos. Las células fueron re-suspendidas en medio R-10.

## 5.6 CITOMETRÍA DE FLUJO.

Para la fenotipificación células por citometría de flujo se utilizaron los siguientes anticuerpos: Anti-TCF1/AF488(AbCam), Anti-GZMB/AF700(B.D.), Anti-PD1/APC (Biolegend), Anti-CD8a/APCCy7(Biolegend), Anti-CD44/BV510(Biolegend), Anti-Ki67/BV605(Biolegend), Anti-IFN $\gamma$ /BV650(Biolegend), Anti-CD28/BV711(B.D.), Viabilidad/FixableAquaViolet(ThermoFisher), Anti-CD69/PE(Biolegend), Anti-Vb5.1/PECy7(Biolegend), Anti-Tim3/PEDazzle594(Biolegend), Anti-CD45.1/PERCP(Biolegend).

Se incubaron aproximadamente  $5 \times 10^5$  células con los anticuerpos de membrana durante 20 minutos a 4°C en oscuridad, posteriormente las células se lavaron 2 veces con PBS, posteriormente fueron teñidas para los marcadores intracelulares utilizando el kit "True Nuclear Transcription Factor Buffer Set" (Biolegend).

Todas las muestras fueron adquiridas en el citómetro FACS Influx Cell Sorter (B.D.) del Centro de Instrumentos (CIS) del Centro Médico Nacional Siglo XXI y analizadas con el Software Flowjo 10.1 (Tree Star, Ashland, OR, United States)

## 5.7 INMUNOFLUORESCENCIA.

Para los ensayos de microscopia de fluorescencia se utilizaron los siguientes anticuerpos: Anti-CD8/FITC (Biolegend), Anti-PD1/APC(Biolegend), Anti-Tim3/PEDazzle594(Biolegend), Anti-TCF1/AF488 (AbCam), Anti-CD8/APC (Biolegend), CellTracker Red y los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 (Life Technologies). Los tumores obtenidos fueron fijados con p-Formaldehído al 4% <sup>v/v</sup> durante 24 h, posteriormente fueron incluidos en bloques de parafina y se obtuvieron cortes histológicos de 5mm de grosor en laminillas cargadas (Superfrost Plus Yellow). Los tejidos fueron desparafinados en estufa a 60°C y. Rehidratados en un tren de solventes de Xilol, Xilol/Etanol, Etanol 100%, Etanol 80% y Etanol 50%. Posteriormente, se recuperaron estructuras antigénicas con un Buffer de citratos pH 6.0 (Citrato de Sodio 10 $\mu$ M) a 90 °C durante 20 minutos. Los tejidos fueron permeabilizados con buffer de permeabilización (10mg/mL de albumina de suero bovino, 5% suero de caballo, 0.02% de Azida de sodio y 0.5% de Triton) durante 2 horas, posteriormente los cortes fueron incubados con los anticuerpos a temperatura ambiente y en oscuridad durante 18 horas. Transcurrido el tiempo se realizaron lavados con PBS y los núcleos fueron contra teñidos con Hoechst durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los tejidos fueron montados en VectaShield (Vector Labs.) y cubiertas. Al día siguiente se adquirieron las imágenes en el microscopio confocal de fluorescencia Nikon A1 con el aumento 20x y se analizaron con el Software ImageJ y FIJI (NIH).

## 5.8 OBTENCIÓN DE ESFEROIDES TUMORALES Y CO-CULTIVO CON CÉLULAS OTI

Para la generación de esferoides tumorales, las líneas celulares fueron cultivadas durante 3 días como se menciona en 5.2, posteriormente fueron puestas en suspensión en medio DMEM suplementado con 1% de matrigel a una concentración de 100 células / $\mu$ L, las células fueron cultivadas en placas de ultra baja adherencia (Corning Costar) y a una concentración final de 1 célula/ $\mu$ l. las células fueron cultivadas durante 7 días hasta obtener las estructuras esferoidales. Posteriormente, los esferoides fueron caracterizados en tamaño y estructura utilizando el microscopio confocal de fluorescencia Nikon A1 con el aumento 10x o fueron co-cultivados con células OTI durante 7 días.

## 5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico se realizó con el software Prism 8 (GraphPad Software, Inc.) y se realizó una prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) de una y dos vías, seguida de una prueba de Tukey para determinar entre que grupos existía diferencia significativa. Una  $P < 0.05$  fue considerada como significativa.

La construcción de graficos t-SNE se generó con ayuda del software Flowjo 10.1 (Tree Star, Ashland, OR, United States). Se exportaron los eventos CD8+ OTI+ (10,000 aproximadamente) en archivos individuales con los parámetros de compensación ajustados. Los archivos fueron después concatenados y se realizó el análisis para t-SNE con el plugin correspondiente a partir de los marcadores TCF1, TIM3, PD-1, CD44, CD28, CD69, IFN $\gamma$ , granzima B y Ki67. Determinando 1000 iteraciones con un número de perplejidad de 30 y un radio de aprendizaje de 180,000. Lo anterior utilizando el algoritmo de gradiente Barnes Hut con KNN exacto.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 OBTENCIÓN DE TUMORES DE MELANOMA SENSIBLES Y RESISTENTES A INMUNOTERAPIA ANTI-PD-1

Para el estudio de los mecanismos de resistencia a inmunoterapia, es determinante el desarrollo de modelos que permitan recapitular la heterogeneidad en la respuesta a inmunoterapia observada en pacientes con melanoma, la cual está estrechamente relacionada con el infiltrado inmune, sobre todo con el fenotipo de los linfocitos T CD8 agotados<sup>15</sup>.

Considerando esto, el primer objetivo abordado en este trabajo fue la obtención de tumores resistentes a inmunoterapia para posteriormente generar líneas celulares resistentes a inmunoterapia. Lo anterior a través de la presión selectiva inmune generada mediante la inmunización de péptidos del antígeno modelo Ovoalbúmina (OVA) en conjunto con un adyuvante que ha demostrado favorecer la inducción de células agotadas funcionales, las cuales han demostrado ser relevantes en la respuesta a inmunoterapia. La hipótesis fue que esta presión inmune sobre las células tumorales resultaría en el desarrollo de mecanismos de evasión inmunitaria, que desencadenarían en la evasión del bloqueo de receptores de inhibición como PD-1. De tal forma que ratones C57 de 8 a 10 semanas fueron inoculados vía s.c con células de melanoma murino que expresan de manera constitutiva el antígeno OVA, transcurridos 7 días fueron inmunizados con péptidos de OVA en conjunto con porinas de *Salmonella thypi* como adyuvante. Una vez que los tumores alcanzaron un volumen crítico de 1000 mm<sup>3</sup> se administraron en 3 ocasiones 100µg de anti PD-1 vía i.p. cada 2 días. **Figura 3A**

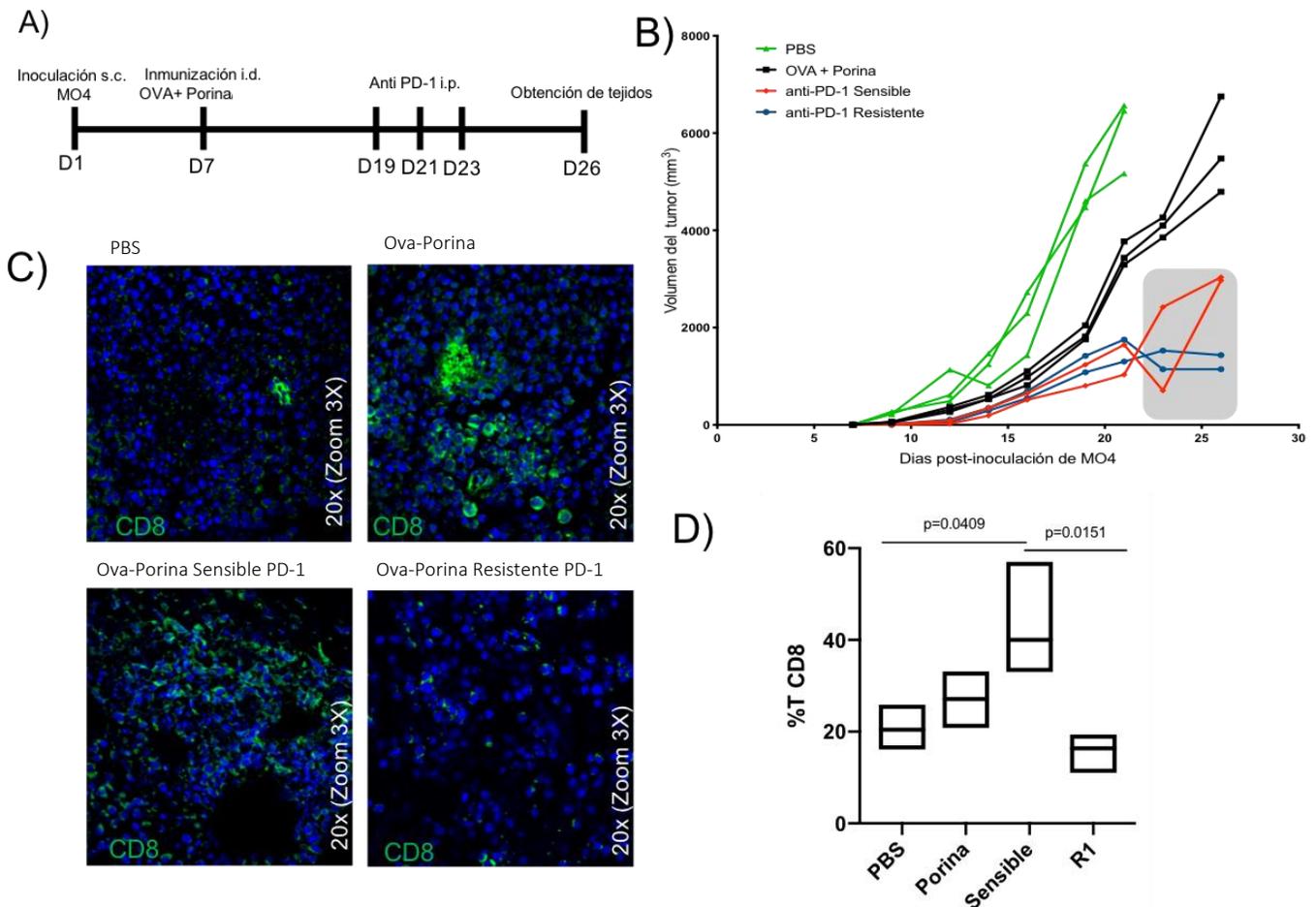
El tratamiento con anti-PD1 se inició al día 19 del crecimiento tumoral, día en el cual se observó el crecimiento exponencial de los tumores implantados (**Figura3B**). De igual forma, en la **Figura 3B** en líneas verdes puede apreciarse el crecimiento tumoral en ratones no inmunizados, mientras que en las líneas negras se aprecia el crecimiento tumoral de ratones inmunizados, en líneas azules se aprecia el crecimiento de tumores de ratones inmunizados y tratados con anti-PD1, los cuales fueron considerados sensibles a inmunoterapia debido a que hubo una respuesta positiva en cuanto al control del crecimiento tumoral después la administración del anticuerpo. Así mismo se aprecia en líneas rojas las curvas de crecimiento tumoral asociadas a ratones inmunizados y tratados con anti-PD1, los cuales no presentaron una respuesta positiva a inmunoterapia y fueron considerados resistentes a la misma.

Inicialmente, se determinó la presencia de linfocitos CD8+ en el infiltrado tumoral de los tumores sensibles y resistentes a inmunoterapia anti-PD1, dado que el infiltrado de estas células ha sido considerado importante como un parámetro para respuesta

a inmunoterapia. Para esto se evaluó la expresión de CD8 por inmunofluorescencia en los cortes histológicos de los tumores obtenidos.

Como se puede observar en la **Figura 3C**, los tumores sensibles a inmunoterapia presentaron un mayor infiltrado de células CD8+ comparado con los tumores resistentes en los que se observó un bajo infiltrado de células T CD8+. Este infiltrado fue inclusive menor en comparación con los tumores de ratones sin inmunizar (PBS) el cual se utilizó como referencia del crecimiento tumoral. De las imágenes obtenidas se cuantificó el porcentaje de células CD8+ confirmando lo observado en las micrografías en donde se obtuvieron diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos T CD8+ en los tumores sensibles en comparación con el grupo control ( $p=0.0412$ ). En contraste, los tumores resistentes presentaron un menor porcentaje de linfocitos T CD8+ el cual fue significativamente diferente comparado con los tumores sensibles a la inmunoterapia con anti-PD-1 ( $p=0.0178$ ). (**Figura 3D**)

Estos resultados sugieren que la respuesta a inmunoterapia se asocia positivamente a la presencia de linfocitos T CD8+ en el infiltrado tumoral.



### Figura 3. Los tumores sensibles a inmunoterapia presentan un mayor infiltrado de linfocitos T CD8.

**A)** Ratones C57BL/6 fueron inoculados i.d. con  $2.5 \times 10^5$  células MO4, 7 días después fueron administrados vía i.d. con Porina en conjunto con OVA o PBS. Al día 19, 21 y 23 se administró vía i.p. anti-PD-1 o PBS en los ratones inmunizados con OVA-Porina. **B)** los tumores fueron medidos cada tercer día y se determinó su respuesta a la inmunoterapia en función de la curva de crecimiento. En verde ratones administrados con PBS, en negro ratones inmunizados con OVA-Porina, en rojo ratones inmunizados resistentes a inmunoterapia y en azul ratones inmunizados sensibles a inmunoterapia. Las curvas muestran el crecimiento individual de los tumores en los ratones implantados con MO4, el área gris sombreada representa los días y grupos experimentales que recibieron inmunoterapia anti PD-1 (100 $\mu$ g) cada 2 días **C)** micrografías representativas de los tumores obtenidos ( $n= 2$  o 3 tumores por tratamiento a los cuales se les realizó una tinción de inmunofluorescencia evaluada por microscopía confocal para la expresión de CD8 (verde), **D)** Cuantificación de células CD8 por cada 100 células presentes en el campo observado,  $n= 3$  campos por tumor, ANOVA de 2 vías seguida de una prueba de Tukey para determinar diferencias significativas entre los grupos, una  $P < 0.05$  fue considerada significativa. Las líneas al centro de las barras corresponden a la media de los datos y los límites de las barras corresponden a la desviación estándar de los datos.

## 6.2 LA RESISTENCIA A INMUNOTERAPIA ANTI-PD1 INVOLUCRA UNA DISMINUCIÓN EN EL INFILTRADO DE LINFOCITOS CD8 TEX

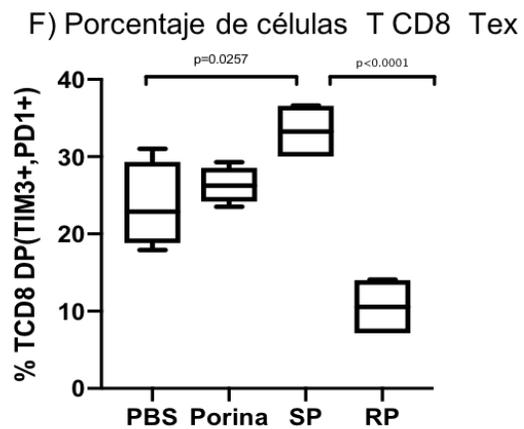
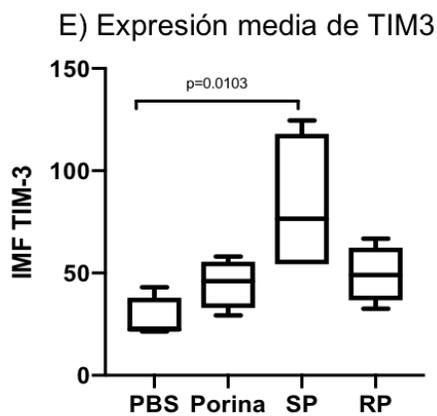
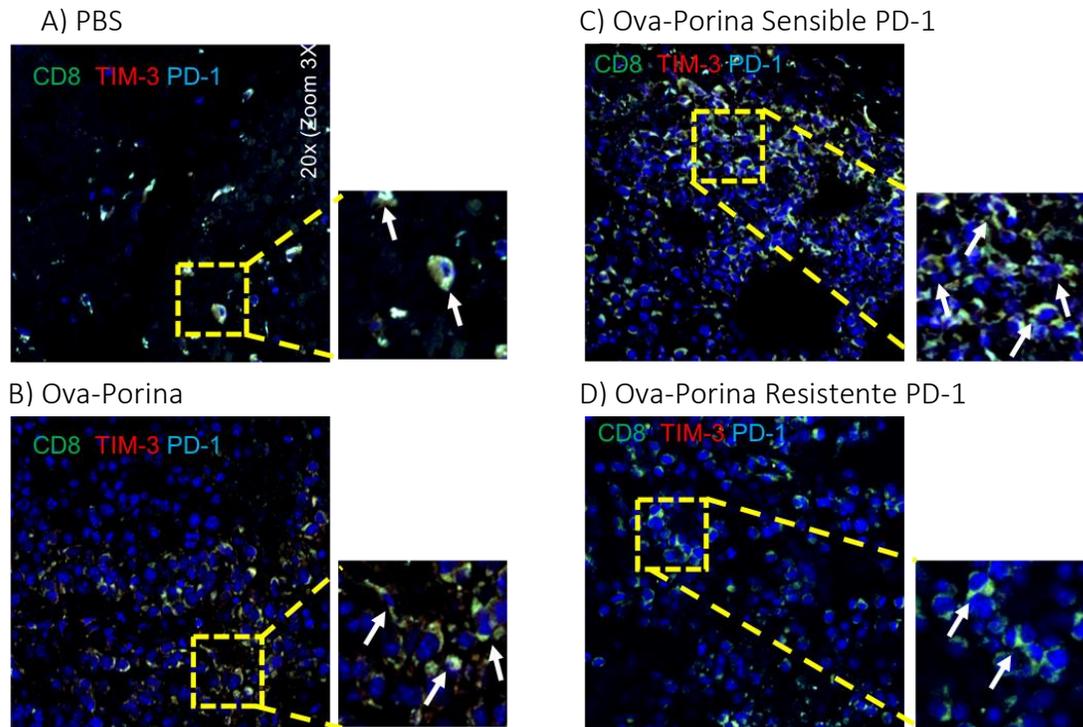
El bajo infiltrado de linfocitos T CD8 observado en las micrografías de tumores resistentes a inmunoterapia (Figura 3) abrió la posibilidad a que esto se debiera a la acumulación de linfocitos agotados, dado que infiltrado de linfocitos T CD8+ con fenotipo terminalmente agotado (Tex) se ha relacionado con un control deficiente del crecimiento tumoral<sup>41</sup>. Contrastantemente, en modelos murinos se ha reportado que esta población incrementa su abundancia, así como su capacidad de expresión de citocinas efectoras después de la inmunoterapia anti-PD-1<sup>34</sup>, por lo que no es del todo claro su relevancia en el infiltrado de tumores sensibles o resistentes a inmunoterapia.

De esta manera se evaluó en los cortes histológicos de los tumores sensibles y resistentes a inmunoterapia la presencia de estos linfocitos T CD8+ Tex y su relación con la respuesta a inmunoterapia anti-PD1 mediante tinciones de inmunofluorescencia.

En la **Figura 4A** puede apreciarse que, en las micrografías obtenidas del grupo administrado con PBS, se observa un infiltrado poco abundante y en particular de células positivas para CD8, las cuales co-expresan TIM3 y PD-1 (Tex). En contraste en la **Figura 4B**, se observa que en el grupo inmunizado con OVA y porinas que no recibió inmunoterapia anti-PD-1, hay un mayor infiltrado de células, sin embargo, este incremento no se debe a un incremento del fenotipo Tex (CD8+, TIM3+, PD1+). En el grupo inmunizado que fue sensible a inmunoterapia se puede apreciar un incremento del infiltrado de células T CD8 con fenotipo Tex, en comparación con los grupos previamente descritos (**Figura 4C**). De manera interesante, se observa un menor infiltrado de linfocitos T CD8 con fenotipo Tex en la micrografía de grupo inmunizado que generó tumores resistentes a inmunoterapia. En donde este infiltrado fue inclusive menor comparado con el grupo control (**Figura 4D**).

Lo observado en las micrografías es consistente con la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia de TIM3, la cual muestra una tendencia a ser mayor en el grupo sensible a inmunoterapia comparado con los demás grupos

( $p=0.0103$ ) (**Figura 4E**). La cuantificación del porcentaje de linfocitos Tex mostró un decremento significativo ( $p<0.0001$ ) del porcentaje de células Tex presentes en el grupo de los tumores resistentes, comparado con el del tumor sensible a inmunoterapia. Este porcentaje en el tumor sensible a inmunoterapia fue significativamente mayor ( $p=0.0257$ ) con respecto al grupo control PBS (**Figura 4F**). Estos hallazgos sugieren que el infiltrado de linfocitos T CD8 con fenotipo Terminal (Tex) incrementa en los tumores sensibles a inmunoterapia anti-PD1 y de manera interesante disminuye significativamente en el contexto de la resistencia a inmunoterapia anti-PD1.



**Figura 4: Incremento de células CD8T<sub>ex</sub> (TIM-3+, PD-1+) en tumores sensibles a inmunoterapia anti-PD-1.** Se obtuvieron cortes histológicos de 5 μm de los tumores sensibles y resistentes a inmunoterapia anti-PD-1. Las muestras fueron incubadas con anticuerpos anti CD8 (verde), anti TIM-3 (rojo) y anti PD-1 (Cyan), se utilizó Hoechst como colorante de contraste de los núcleos (azul). **A, B, C y D)** micrografías representativas de tumores de ratones tratados con: **A)** PBS, **B)** Inmunizados con Porina **C)** Inmunizados con Porina y sensible a anti PD-1 y **D)** Inmunizados con Porina y resistentes a anti PD-1, **E)** Intensidad media de fluorescencia de TIM3 en los tratamientos, **F)** Cuantificación de células CD8+, TIM3+, PD1+ (Tex) por cada 100 células por campo. Las flechas blancas indican las células Tex. Imágenes representativas de los tumores obtenidos (n=2o 3 tumores por grupo) Se cuantificaron 3 campos por tejido. Aumento 20x con zoom 3x. ANOVA 1 vía, prueba de Tukey  $\alpha=0.05$ . Las líneas al centro de las barras representan la media de los datos

### 6.3 EL DECREMENTO DE CÉLULAS CD8 TEX EN EL CONTEXTO DE LA RESISTENCIA A INMUNOTERAPIA ANTI-PD1 SE ACOMPAÑA POR UN BAJO INFILTRADO DE CÉLULAS CD8TPEX.

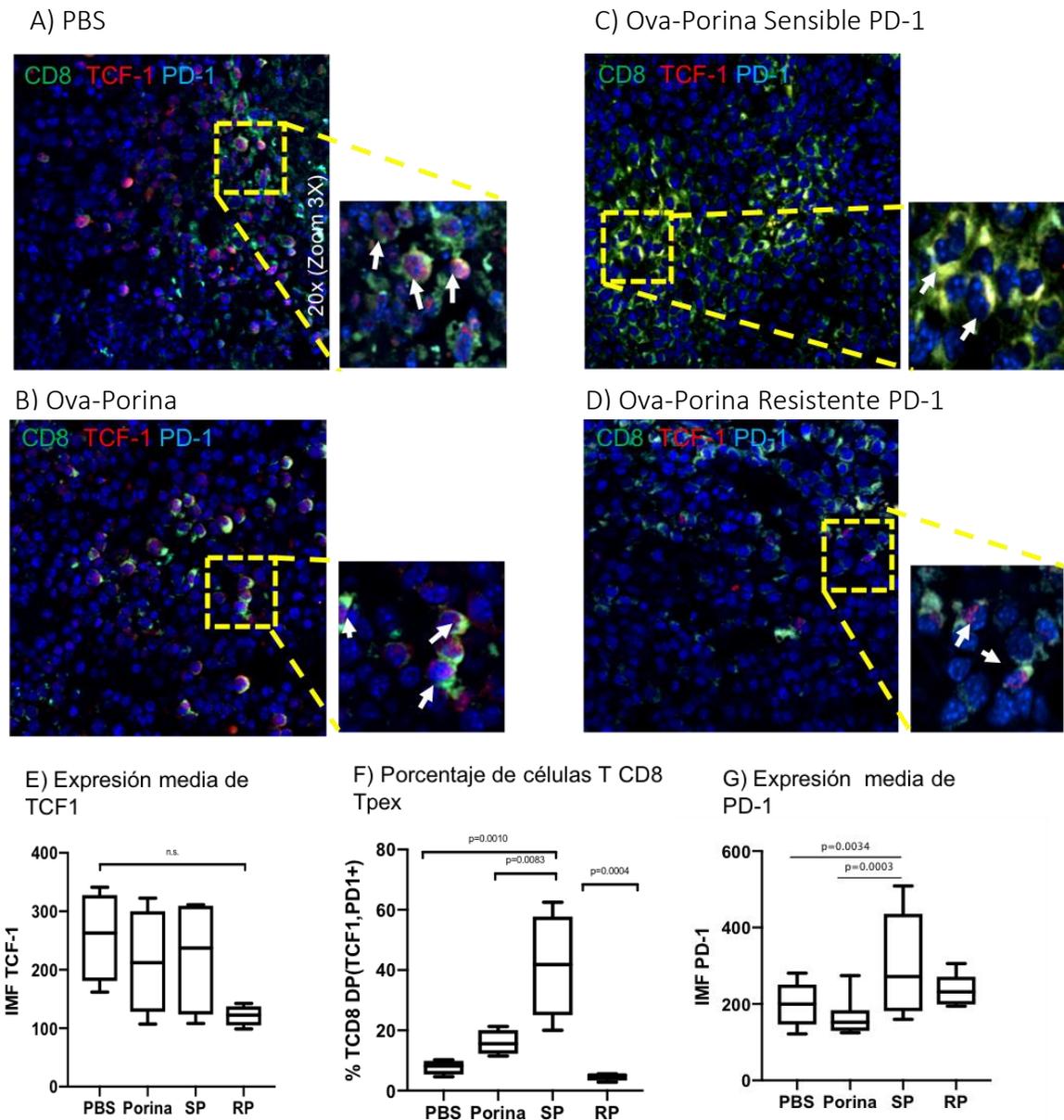
El bajo infiltrado de linfocitos T CD8 Tex observado en los tumores resistentes pudiera relacionarse con la falta de linfocitos T agotados con fenotipo precursor, dado que trabajos recientes han demostrado que el infiltrado de células T CD8 Tex en tumores de melanoma murino depende estrechamente del infiltrado de células T CD8 agotadas con fenotipo precursor (Tpex)<sup>34</sup>. Debido a que los linfocitos Tpex proliferan después de la inmunoterapia anti-PD-1 y se diferencian con mayor abundancia hacia Tex, sugiriendo que la presencia de linfocitos Tpex pudiera ser determinante en la respuesta a esta terapia. Esto llevó a evaluar el infiltrado de linfocitos T CD8 Tpex mediante tinciones de inmunofluorescencia en los cortes histológicos de tumores sensibles y resistentes a inmunoterapia anti-PD-1.

Las micrografías obtenidas del grupo control muestran la presencia de pocos linfocitos T CD8 infiltrantes de tumor que co-expresan TCF1 y PD-1 (Linfocitos Tpex) (**Figura 5A**). Se aprecia también la expresión de TCF1 en células CD8-, las cuales parecen más abundantes que las células T CD8 Tpex. Puede observarse además que, en el grupo inmunizado con porinas, también hay células T CD8 que co-expresan TCF1 y PD-1(**Figura 5B**). Las cuales son más abundantes en comparación con el grupo control e interesantemente en dichas micrografías se aprecia que la localización del factor de transcripción TCF1 podría no ser exclusivamente nuclear, dado que una pequeña fracción de la marca asociada a este factor (rojo) coincide con la marca asociada a moléculas que normalmente se encuentran fuera del núcleo (azul), como es el caso de CD8 (verde) y PD-1 (Cyan).

Así mismo, en el grupo sensible a inmunoterapia es evidente que hay un incremento sustancial en el infiltrado de linfocitos T CD8 comparado con el grupo control, los cuales en su mayoría co-expresan PD-1 y TCF1, este último parece no estar localizado en núcleo dado que no coinciden ambas marcas, sugiriendo que la inmunoterapia anti-PD1 tiene un efecto importante en la localización celular de

TCF1(**Figura 5C**). En contraste, puede apreciarse que en el grupo resistente a la inmunoterapia anti-PD1 disminuyen drásticamente las células CD8 que expresan TCF1 y que su localización, al igual que en el control, pudiera ser predominantemente nuclear, dado que ambas marcas coinciden (**Figura 5D**).

Por otra parte, la cuantificación de la IMF de TCF1 de la **Figura 5E** muestra una tendencia a una menor expresión de TCF1 en las micrografías obtenidas del grupo resistente a inmunoterapia, comparado con los grupos control y el grupo sensible a inmunoterapia. De igual forma, la cuantificación del porcentaje de células T CD8 con fenotipo precursor demostró un incremento significativo ( $p=0.004$ ) de T<sub>pex</sub> en el grupo sensible respecto al grupo resistente, así mismo se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células CD8 T<sub>pex</sub> ( $p=0.0010$  y  $p=0.0083$ ) entre el grupo sensible y los controles PBS y porina (**Figura 5F**). De forma interesante, se observó que la expresión de PD-1 es mayor en los tumores sensibles a inmunoterapia, sugiriendo que tanto la expresión de este marcador junto con TCF1 es determinante en la respuesta positiva a inmunoterapia anti PD-1. Contrastante a lo anterior, se observó que la expresión de PD-1 en los tumores resistentes es menor respecto al grupo sensible, pero no menor a los grupos control (**Figura 5G**). Estos datos sugieren que la resistencia a inmunoterapia anti PD-1 se asocia con un bajo infiltrado de T<sub>pex</sub>, lo cual podría estar asociado al bajo infiltrado de T<sub>ex</sub>. Sugiriendo también que la resistencia a inmunoterapia podría asociarse a un compromiso en la proliferación y diferenciación de los linfocitos T<sub>pex</sub>.



**Figura 5: El incremento de células CD8T<sub>ex</sub> en tumores sensibles a inmunoterapia anti-PD-1 se relaciona con la expresión de TCF-1.** Se obtuvieron cortes histológicos de 5 μm de los tumores sensibles y resistentes a inmunoterapia anti-PD-1. Las muestras fueron incubadas con anticuerpos anti CD8 (Verde), anti TCF-1 (Rojo) y anti PD-1 (Cyan), Se utilizó Hoechst como colorante de contraste de los núcleos (Azul). **A, B, C y D)** Micrografías representativas de tumores de ratones tratados con: **A)** PBS, **B)** Inmunizados con porina **C)** inmunizados con porina y sensible a anti PD-1 y **D)** inmunizados con porina y resistentes a anti PD-1. **E)** Intensidad media de fluorescencia de TCF1 en los tratamientos, **F)** Cuantificación de células CD8+, TCF1+, PD1+ (Tpex) por cada 100 células por campo. **G)** Intensidad media de fluorescencia de PD-1 en los tratamientos. Las flechas blancas indican las células Tpex y la localización de TCF1. Imágenes representativas de los tumores obtenidos (n= 2 o 3 por grupo de un experimento independiente). Se cuantificaron 3 campos por tejido. Aumento 20x con zoom 3x. ANOVA 2 vías, prueba de Tukey α=0.05. Las líneas al centro de las barras representan la media de los datos

## 6.4 LAS CÉLULAS DE MELANOMA MURINO FORMAN ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES (ESFEROIDES) EN CULTIVOS IN VITRO

Los hallazgos obtenidos en el modelo de inmunización que llevo al desarrollo de resistencia a inmunoterapia anti-PD1, sugieren la adquisición de mecanismos de resistencia *in vivo* por parte de las células tumorales. Y abren la interrogante sobre la capacidad de estas células de mantener y recapitular el fenotipo de resistencia *in vitro*, para poder estudiar los mecanismos celulares asociados a la resistencia a inmunoterapia anti-PD-1.

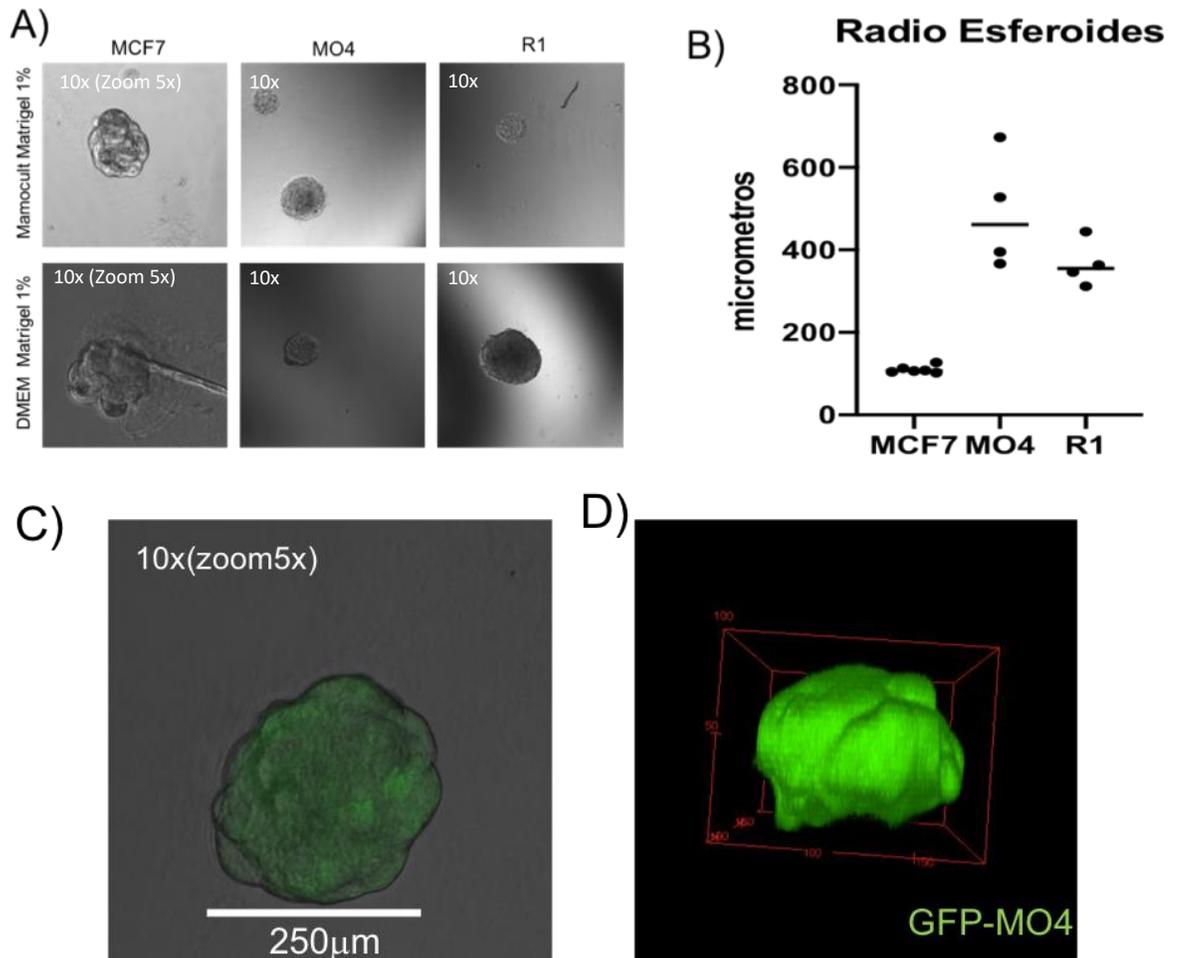
Por lo que las células obtenidas de tumores resistentes a inmunoterapia fueron cultivadas y expandidas con el fin de estudiar los mecanismos asociados a la resistencia a inmunoterapia dependientes del contacto de células tumorales y linfocitos T CD8 *in vitro*; Utilizando esferoides tumorales, los cuales han demostrado ser una excelente estrategia experimental para poner de manifiesto mecanismos de resistencia tumoral a otras terapias como lo es la terapia con antineoplásicos.

Para la generación de estructuras tridimensionales se cultivaron las células resistentes a inmunoterapia, así como la línea celular parental MO4 y una línea celular de cáncer de mama humano (MCF7) en placas de ultra baja adherencia y con medio de cultivo (DMEM o Mamocult) suplementado con 1% de matrigel durante 7 días. La línea MCF7 fue utilizada como control positivo para la generación de esferoides tumorales, ya que se ha descrito que puede formar dichas estructuras tridimensionales bajo las condiciones de cultivo mencionadas

En la **Figura 6A** se muestran las imágenes de microscopia confocal de campo claro en donde se aprecia que tanto en las condiciones de cultivo reportadas para la generación de esferoides de MCF7 (Mamocult), como en las condiciones de cultivo para las células MO4 (DMEM), pueden obtenerse estructuras esferoidales con la línea celular de referencia (MCF7) y de manera interesante también con las líneas celulares de melanoma murino en ambas condiciones de cultivo. De esta manera, en experimentos subsecuentes se utilizó DMEM para la formación de estructuras tridimensionales de melanoma. La cuantificación del radio de las estructuras reveló que los esferoides generados con la línea parental de melanoma murino que no fue sometida a presión selectiva con inmunización ni al tratamiento anti-PD1 (MO4) o con una de las dos líneas celulares provenientes de tumores resistentes a inmunoterapia (R1) son más grandes en comparación con la línea de referencia MCF7 (**Figura 6B**), lo cual indica que las condiciones de cultivo empleadas son óptimas para la generación de esferoides. La estructura tridimensional esferoidal fue comprobada usando una línea de melanoma (MO4) que expresa constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP). En la **Figura 6C** se observa en el traslape de campo claro con la fluorescencia del canal verde, la formación de

estructuras de alrededor de 250  $\mu\text{m}$  de radio, las cuales tienen una forma esferoidal (**Figura 6D**).

Estos hallazgos indican que las células de melanoma murino pueden formar estructuras tridimensionales (esferoides) *in vitro*.



**Figura 6: Desarrollo de esferoides tumorales como modelo *in vitro* para el estudio de mecanismos de resistencia a inmunoterapia:** Células MCF7, MO4 y R1 fueron puestas en cultivo en placas de ultra baja adherencia con medio (DMEM o Mamocult) suplementado con 1% de matrigel, transcurridos 7 días las estructuras tridimensionales fueron evaluadas por microscopia confocal **A)** Imágenes representativas de la morfología de los esferoides formados por las líneas celulares MCF7, MO4 y las células derivadas de un tumor resistente a inmunoterapia anti-PD1 en las distintas condiciones de cultivo. **B)** Radio promedio en micrómetros de los esferoides formados en DMEM 1% **C)** Esferoide Formado con la línea parental de melanoma de ratón B16-GFP y **D)** Reconstrucción Tridimensional a partir de cortes en Z del esferoide mostrado en C. Imágenes representativas de resultados de un experimento independiente con n=3 repeticiones y cuantificación de 4-5 campos por condición. Aumento 10x y zoom5x donde se indica.

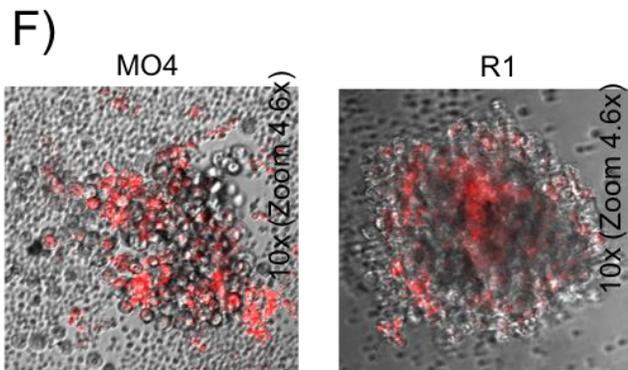
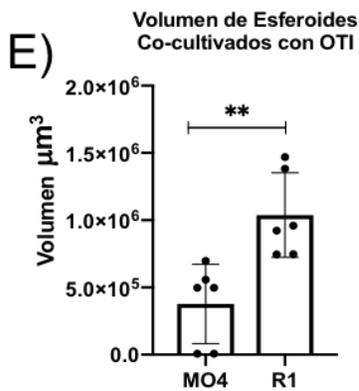
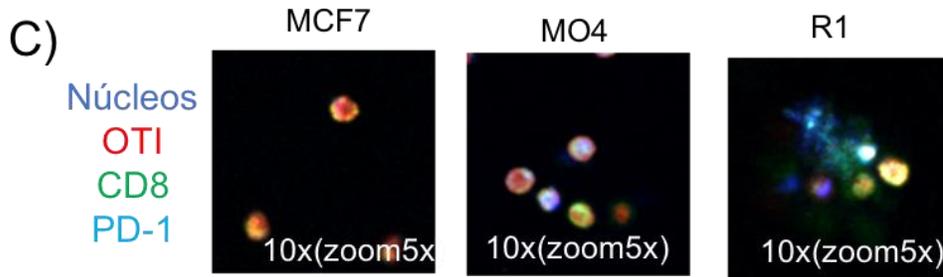
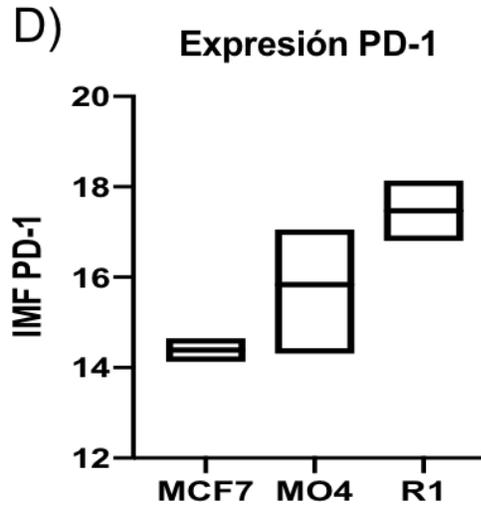
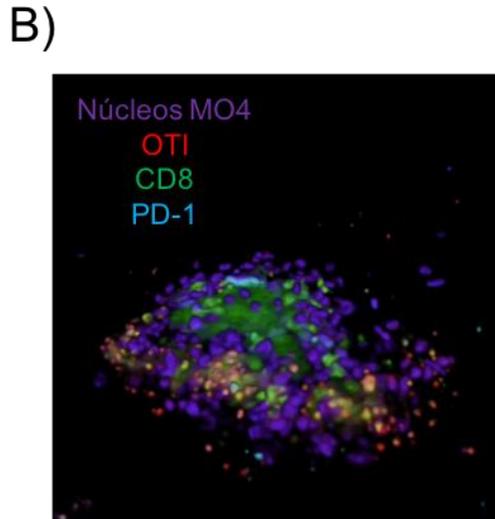
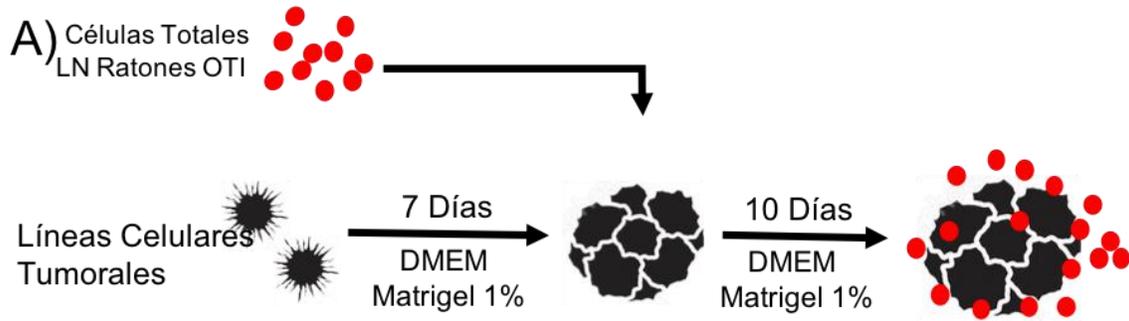
## 6.5 EL CONTACTO DE ESFEROIDES TUMORALES DE MELANOMA MURINO CON LINFOCITOS OTI INDUCE LA EXPRESIÓN DE PD-1.

Con el fin de demostrar que en el modelo *in vitro* generado era posible la interacción de linfocitos T con los esferoides tumorales, se pusieron en co-cultivo las estructuras tridimensionales de melanoma murino que expresan el antígeno modelo OVA con células totales de ganglio linfático de ratones OTI CD45.1, de los cuales se ha reportado que cerca del 75% de linfocitos son linfocitos T CD8, que reconocen en su TCR péptidos de OVA presentados en el contexto de MHC-I (Linfocitos OTI) durante 7 días y se realizaron inmunofluorescencias en los esferoides o en los linfocitos OTI. En la **Figura 7A** se muestra la estrategia experimental.

En la **Figura 7B** se muestra la reconstrucción tridimensional en donde se observa que las células de ratones OTI (Rojo) que expresan CD8 (Verde), es decir, linfocitos OTI, interactúan con la superficie de los esferoides formados (Morado) y que además pueden penetrar dichas estructuras. Se aprecia además que algunos linfocitos OTI muestran expresión de PD-1 (Cyan). De igual manera, la tinción de inmunofluorescencia realizada sobre los linfocitos OTI demuestra que estos pueden expresar PD-1 cuando están en contacto con las células tumorales que expresan OVA (MO4, R1) y no cuando son co-cultivados con células que no expresan este antígeno y que además son de otra especie (MCF7) **Figura 7C**. También se aprecia que los linfocitos OTI en contacto con esferoides de las células obtenidas de los tumores resistentes a inmunoterapia muestran una tendencia a una mayor intensidad de fluorescencia de PD-1 respecto a los cultivados con la línea parental MO4 o con la línea control MCF7 (**Figura 7D**).

Sumado a lo anterior, en la **Figura 7E** se observa que el volumen de los esferoides de R1 en contacto con linfocitos OTI es significativamente mayor al volumen de los esferoides de MO4 ( $p < 0.01$ ). Así mismo, cuando las células de la línea MO4 o R1 fueron puestas en cultivo con linfocitos OTI previo a la formación de estructuras tridimensionales, se observó que solamente la línea R1 fue capaz de generar los esferoides (**Figura 7F**).

Estos resultados en conjunto indican el potencial del modelo *in vitro* para recapitular el agotamiento de células CD8 observado *in vivo* evidenciado por la expresión de PD-1, los resultados sugieren además que las células R1 poseen mecanismos de evasión del control inmunitario, los cuales podrían estar potencialmente asociados a la resistencia a inmunoterapia.



**Figura 7: Las células OTI en contacto con esferoides tumorales singénicos expresan PD-1:**

Células totales de ganglios linfáticos de ratones OTI fueron obtenidas por maceración y marcadas con un trazador fluorescente rojo y puestas en co-cultivo con esferoides de las líneas celulares MCF7, MO4 y R1 durante 7 días, transcurrido el tiempo se tiñeron las estructuras para inmunofluorescencia confocal con anti CD8 (verde), anti PD-1 (Cyan) y Hoechst para teñir los núcleos. **A)** Diagrama experimental **B)** Reconstrucción tridimensional a partir de cortes en Z obtenidos por microscopía confocal de fluorescencia de esferoides cultivados con células OTI, MO4 (Morado), OTI (Rojo), CD8 (Verde), PD-1 (Cyan). **C)** Micrografías representativas de la tinción de inmunofluorescencia realizada sobre células OTI en contacto con esferoides tumorales Núcleos (Azul), OTI (Rojo), CD8 (Verde), PD-1 (Cyan). **D)** Intensidad media de fluorescencia de PD-1 de los campos tomados en C. **E)** Volumen de esferoides co-cultivados con células OTI. **F)** Micrografías del co-cultivo de células OTI (Rojo) y MO4 o R1. Imágenes representativas de 1 experimento independiente con una n= 5 repeticiones por condición, se cuantificaron 3 campos por repetición. Aumento 10x y zoom 4.6x donde se indica. ANOVA de 1 vía seguida de una prueba de Tukey con  $\alpha=0.05$

## 6.6 LA ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS OTI POR EL CONTACTO DE ESFEROIDES TUMORALES ES DISTINTA A LA ACTIVACIÓN CON PHA.

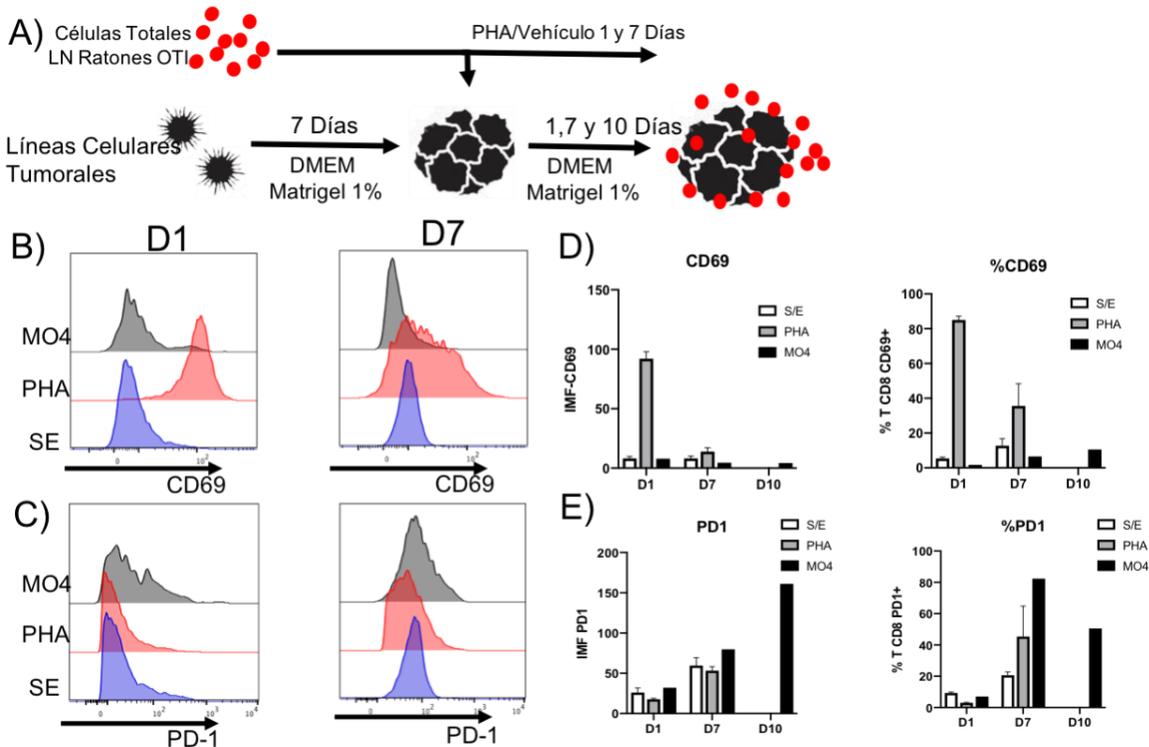
Una vez establecido el sistema de esferoides tumorales como modelo donde se observa la interacción entre linfocitos T con células tumorales, se determinó si con este se podría lograr la activación de células OTI considerando que en las células totales de LN de ratones OTI también pueden encontrarse APCs que pueden activar y diferenciar células T. Para esto las células totales de ganglio linfático de ratones OTI CD45.1 fueron puestas en cultivo con esferoides previamente formados de la línea MO4 y el fenotipo de los linfocitos en contacto con los esferoides se comparó con un estímulo control de activación de linfocitos T como fitohemaglutinina (PHA). La caracterización fenotípica de linfocitos T OTI se realizó mediante la expresión de TCRVb5.1, CD45.1 y CD8, como se muestra en el Anexo 1, y la nomenclatura de los experimentos se simplificó denominando a las células de ganglio linfático de ratones OTI como "OTI".

Se realizó una cinética de cultivo de 1, 7 y 10 días. Se evaluó la expresión de CD69 como marcador de activación de linfocitos T y la inducción de agotamiento se determinó mediante la expresión de PD-1. En la **Figura 8A** se muestra el diagrama experimental.

En los histogramas mostrados en la **Figura 8B** se puede observar que la activación con PHA se da desde el día 1 de estimulación y se mantiene hasta el día 7, mientras que en las células en contacto con esferoides de MO4 no se observa un incremento de CD69 en los tiempos evaluados. Lo anterior se observa en las gráficas de barras mostradas en la **Figura 8D**, donde se aprecia que la expresión de CD69 derivada de la activación con PHA, así como el porcentaje de células CD8+ CD69+ tiene una cinética descendente, mientras que en la condición de estimulación con MO4 no se observan cambios en la expresión de CD69 ni en el porcentaje de células CD8 CD69+ en los puntos cinéticos evaluados.

En contraste, se observa en la **Figura 8C** que, en los histogramas, la expresión de PD-1 es superior en las condiciones donde se estimuló a las células linfoides de ratones OTI con la línea MO4. La expresión de PD-1 en linfocitos OTI, se observó desde el día 1 con un incremento al día 7 y 10 de cultivo, teniendo como máximo de

expresión el día 10 (**Figura 8E**). El efecto diferencial en la activación por las estructuras tridimensionales y PHA también se observa con la cuantificación de IMF de ambos marcadores, así como en el porcentaje de células CD69+ y células PD-1+ (**Figura 8 D y E**). Estos datos en conjunto sugieren que las células linfoides de ratones OTI (entre ellas las células T CD8) en contacto con esferoides tumorales, sufren un proceso distinto de activación al inducido por PHA caracterizado por la expresión de PD-1 y no de CD69.



**Figura 8: Diferencias Fenotípicas en Linfocitos OTI activados con PHA o con esferoides de**

**MO4 in vitro.** Células totales de ganglios linfáticos de ratones OTI fueron obtenidas por y puestas en co-cultivo con PHA durante 1 y 7 días o con esferoides de la línea celular MO4 durante 1,7 y 10 día, las células fueron teñidas para citometría de flujo. **A)** Diagrama experimental **B)** Intensidad de fluorescencia de CD69 y **C)** Intensidad de fluorescencia de PD-1 en los distintos tratamientos al día 1 y 7, en Azul OTI sin estimular, en rojo OTI activados con PHA y en negro OTI co-cultivados con esferoides tumorales de MO4. **D)** cuantificación del porcentaje de células CD8 CD69+ e IMF de CD69 **E)** %CD8 PD-1+ e IMF de PD-1 en los puntos cinéticos evaluados de los distintos tratamientos, en Barras Blancas el control sin estimular (PBS), en barras grises linfocitos OTI estimulados con PHA y en barras negras linfocitos OTI co-cultivados con esferoides tumorales de MO4. Resultados de un experimento independiente con n= 3 ó 1 repeticiones por cada punto cinético.

## 6.7 EL CONTACTO DE CÉLULAS OTI CON ESFEROIDES TUMORALES DE CELULAS RESISTENTES A INMUNOTERAPIA INDUCE LA ACUMULACIÓN DE PROGENITORES EXHAUSTOS

La reciente descripción de 4 fenotipos de agotamiento en el contexto tumoral por Beltra y colaboradores dejó la interrogante sobre el efecto de la inmunoterapia en cada uno de estos fenotipos, particularmente en la resistencia a inmunoterapia anti-PD1. De tal forma que para determinar la relación entre los distintos fenotipos de agotamiento de linfocitos T con la resistencia a inmunoterapia se evaluó el fenotipo de agotamiento que inducen los esferoides de las células resistentes a la inmunoterapia comparado con el fenotipo que induce la línea parental MO4 mediante la expresión de TCF1 y CD69 en linfocitos OT1 agotados (PD1+), utilizando el sistema de co-cultivo previamente descrito.

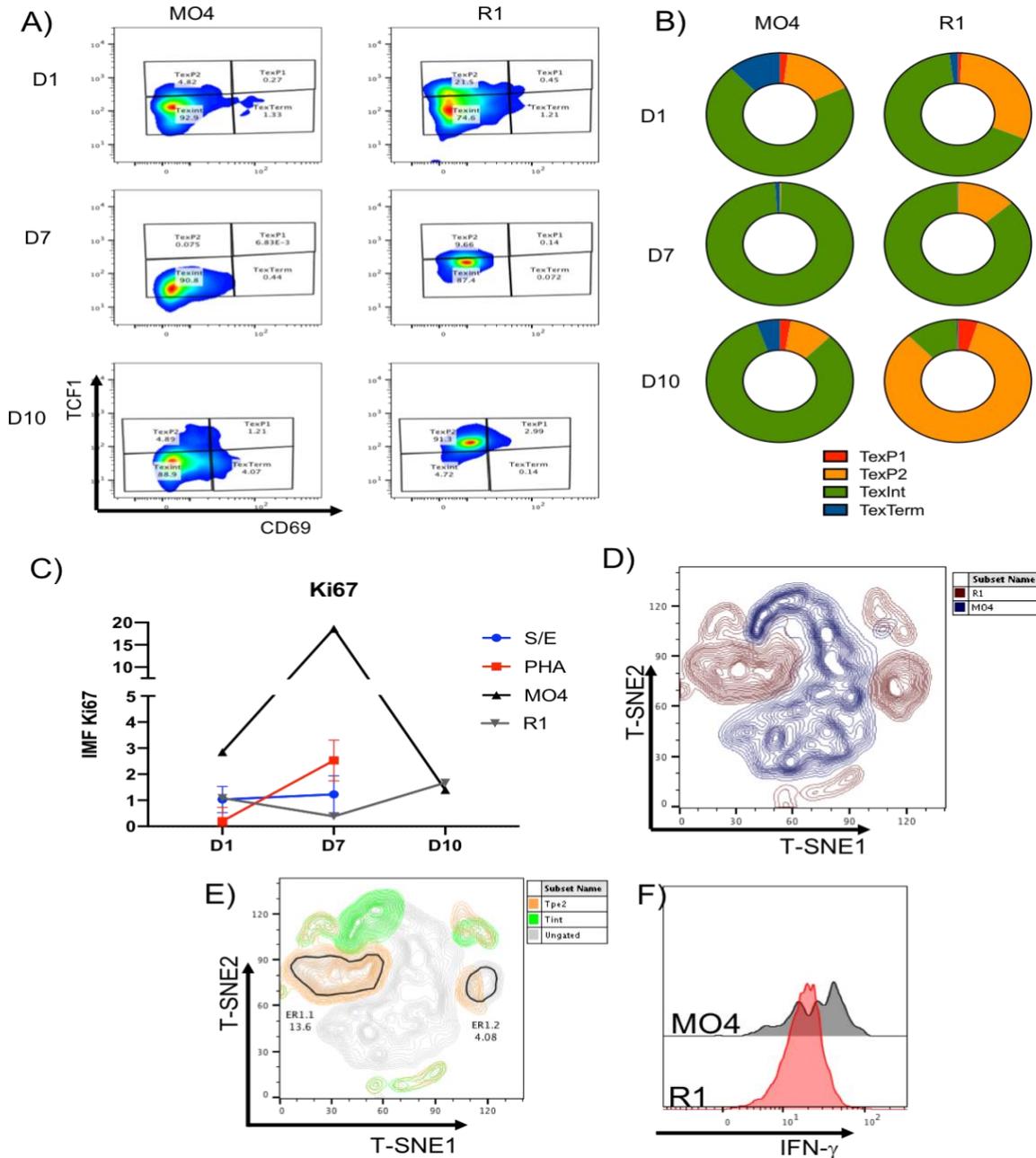
En la **Figura 9A** se observa, en los *plots* representativos, que el contacto de linfocitos OTI con esferoides de MO4 induce principalmente el fenotipo TexTrans y en tiempos tardíos hay un ligero incremento de T<sub>pex2</sub>. En contraste, el contacto de linfocitos OTI con esferoides de células R1 induce principalmente T<sub>pex2</sub> desde el día 7 de estimulación. Estos datos sugieren que el contacto con esferoides tumorales de R1 favorece la presencia de precursores exhaustos tipo 2.

Los gráficos mostrados en la **Figura 9B** muestran de manera esquemática el resultado descrito en donde se observa que en el contacto con esferoides de MO4, la cinética de generación de los distintos fenotipos de células agotadas pasa por la generación de TexInt y TexTerm al día 1. Siendo el día 7 donde hay mayor porcentaje de TexInt y al día 10 se aprecia un porcentaje considerable de los demás fenotipos como TexTerm, pero se acumulan preferencialmente TexInt. Contrario a lo anterior, en el contexto del contacto con esferoides R1 es visible que desde el día 1 hay un alto porcentaje de TexInt tal y como sucede con MO4, pero también hay una proporción de T<sub>exp2</sub>, los cuales disminuyen al día 7 en donde la mayoría de linfocitos OTI tienen fenotipo TexInt, los cuales interesantemente no se observan al día 10, siendo abundantes de nuevo los linfocitos OTI con fenotipo T<sub>exp2</sub> (**Figura 9B**) Sugiriendo entre el día 7 y 10 en el contexto del cultivo con esferoides R1 el contacto con estas células tumorales, comprometió la diferenciación de los linfocitos OTI agotados.

Sumado a esto, la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia de Ki67 en los puntos cinéticos evaluados, indica que los linfocitos OTI en contacto con R1 tienen comprometida la expresión de dicho marcador y, por lo tanto, la proliferación (**Figura 9C**). De manera interesante, en los linfocitos OTI estimulados con esferoides de células tumorales MO4 hay una mayor expresión de Ki67 al día 7. Esta expresión fue la máxima observada en la cinética, indicando que la estimulación por la línea MO4 es suficiente para inducir la proliferación de OTI.

La reducción dimensional generada a través de gráficos de t-SNE (**Figura 9 D y E**) mostró que los linfocitos OTI en contacto con esferoides de MO4 poseen diferencias fenotípicas en comparación con los linfocitos OTI en contacto con R1, entre ellas la acumulación de una población de células precursoras Tpex2 (ER1.1 y ER1.2). Estas poblaciones precursoras Tpex2 abundantes en los linfocitos OTI en contacto con esferoides de R1, se caracterizaron por expresar en menor cantidad IFN- $\gamma$  en comparación con los linfocitos OTI Tpex2 en contacto con esferoides de MO4(**Figura 9F**). Indicando que, a pesar de compartir marcadores fenotípicos, las células Tpex2 generadas en el contexto del contacto con R1 tienen comprometida su función.

Estos resultados sugieren que hay diferencias en la cinética de activación y diferenciación entre los linfocitos en contacto con esferoides de MO4 y los linfocitos en contacto con esferoides de R1, lo cual sumado a la baja expresión de Ki67 y la generación predominante de células Tpex2 con menor expresión de IFN- $\gamma$  en contacto con R1, advierte que el posible mecanismo de resistencia a inmunoterapia pudiera estar asociado con un compromiso en la diferenciación, proliferación y función de los linfocitos T CD8 agotados.



**Figura 9: Diferencias Fenotípicas en Linfocitos OTI co-cultivados con esferoides de MO4 y células resistentes a inmunoterapia.**

Células totales de ganglios linfáticos de ratones OTI fueron obtenidas por maceración y puestas en co-cultivo con esferoides de las líneas celulares MO4 y R1 durante 1, 7 y 10 días, las células fueron teñidas para citometría de flujo **A)** Plots representativos en cada punto cinético para las poblaciones de agotamiento caracterizadas a partir de la expresión de CD69 y TCF1. TCF1<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (TpeX1), TCF1<sup>+</sup>CD69<sup>-</sup> (TpeX2), TCF1<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (Texint), TCF1<sup>+</sup>CD69<sup>-</sup> (Texterm). **B)** Gráficos de dona para la distribución de las poblaciones de agotamiento al día 1 y 7. En Rojo TexP1, en Naranja TexP2, en Verde Texint, en Azul TexTerm. **C)** Cuantificación de IMF para la expresión de Ki67 en células OTI de los distintos tratamientos. En azul (control sin estimular), rojo (Control activado con PHA), Negro (esferoides MO4), Gris (esferoides R1). **D)** Agrupación estocástica (tSNE) de las células OTI en cada tratamiento al día 10. En morado se observa la topología asociada al contacto con R1 y en azul la asociada a MO4. **E)** Localización de las poblaciones TexP2 (Naranja) y TexInt (Verde) en el tSNE generado. ER1.1 y ER1.2 corresponden a clústeres exclusivos del contacto con R1. **F)** Histogramas para la expresión de IFN $\gamma$  en células TpeX2 en contacto con MO4 (Negro) o R1(rojo) al día 10. Resultados de un experimento independiente, n= 3 o 1 repeticiones por cada punto cinético. Los t-SNE fueron generados en función de la expresión de Ki67, TCF1, TIM3, PD-1, CD28, CD69, IFN $\gamma$  y granzima B en células OTI no naive (CD8<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, TCRVb5<sup>+</sup> y CD45.1<sup>+</sup>).

## 6.9 EL CONTACTO DE CÉLULAS OTI DEFICIENTES DE PD-1 CON ESFEROIDES TUMORALES DE LÍNEAS RESISTENTES A INMUNOTERAPIA ACENTÚA LA ACUMULACIÓN DE PRECURSORES DE TEX.

Tomando en cuenta las diferencias encontradas en la inducción de diferentes fenotipos de linfocitos T agotados que estuvieron en contacto con los esferoides de células tumorales resistentes a inmunoterapia con anti-PD-1 y la línea MO4 parental, evaluamos si estas diferencias se asociaban a la presencia de PD-1. Por lo que se utilizaron células totales de ganglio linfático de ratones OTI CD45.1 carentes de la expresión de PD-1 (*pdcd1<sup>-/-</sup>*) y se pusieron en contacto con esferoides de MO4 o de R1 (**Figura 10A**).

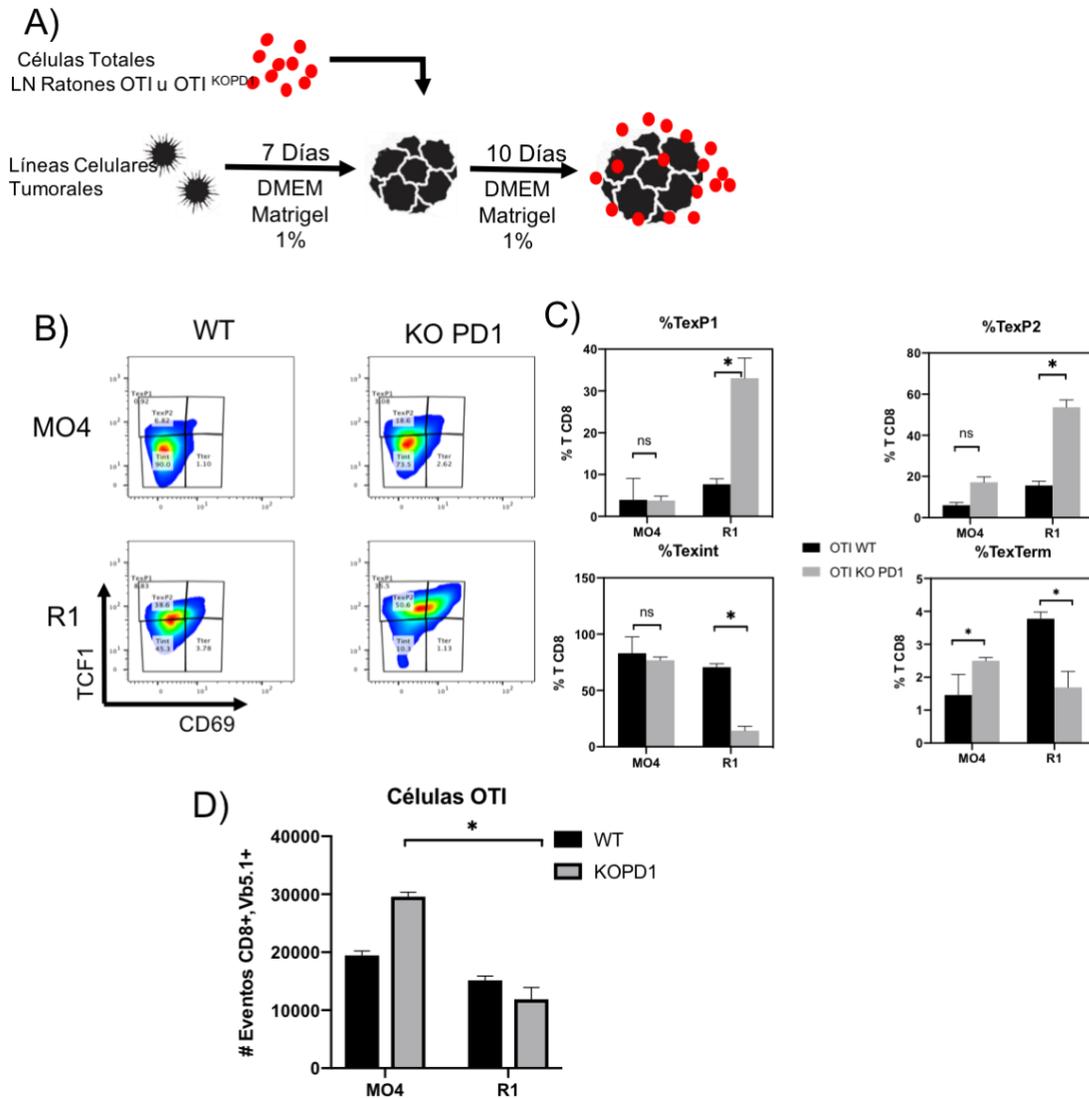
En los *plots* representativos mostrados en la Figura **10B** se observa que los linfocitos OTI WT, co-cultivados con esferoides de R1, se diferencian preferencialmente al fenotipo T<sub>pex2</sub>, mientras que los linfocitos OTI WT co-cultivados con esferoides de MO4 se diferencian principalmente a células TexInt coincidiendo con lo observado en la **Figura 9A**.

De manera interesante, la ausencia de PD-1 en los linfocitos OTI (KOPD1) que estuvieron en contacto con los esferoides de R1 indujo una acumulación acentuada de precursores, tanto T<sub>pex1</sub> como T<sub>pex2</sub>, mientras que el en co-cultivo de linfocitos OTI KOPD-1 con esferoides de MO4 indujo un fenotipo similar al observado en el co-cultivo con su contraparte WT (**Figura 10B**). Lo que sugiere que la acumulación de precursores se asocia a los mecanismos de resistencia presentes en las líneas celulares tumorales y la ausencia de PD1 acentúa dichos mecanismos de compromiso en la diferenciación de células T CD8 agotadas

Lo anterior coincide con la cuantificación mostrada en la **Figura 10C**, en donde se aprecia que el número de células agotadas precursoras (T<sub>exp1</sub> y T<sub>exp2</sub>) en la condición de cultivo de esferoides R1 con linfocitos OTI KOPD1 es significativamente mayor inclusive respecto a la condición de cultivo de esferoides de R1 con su contraparte WT ( $p < 0.05$ ). Sumado a esto, se observa que la ausencia de PD-1 en células cultivadas con esferoides de R1 repercute de manera significativa ( $p < 0.05$ ) en la disminución de células Texint. Esto sugiere que la presencia de PD-1 en células agotadas cumple con un papel relevante en la diferenciación de los fenotipos de agotamiento de linfocitos T CD8.

Por último, en la **Figura 10D** se puede observar que la abundancia de los linfocitos OTI es menor cuando estas células son co-cultivadas con esferoides tumorales de líneas resistentes y los números no se recuperan con la ausencia de PD-1, en contraste con lo observado en los linfocitos OTI co-cultivados con esferoides de MO4 donde se aprecia que la ausencia de PD-1 incrementa la abundancia de dichas células

En conjunto estos resultados sugieren que el mecanismo de resistencia a inmunoterapia anti-PD1 adquirido por las células tumorales sujetas a presión inmune selectiva, involucra un bloqueo en la proliferación y diferenciación de las células T que probablemente sea independiente de la función inhibitoria de PD-1 dado que la ausencia de este receptor de inhibición no pudo revertir el fenotipo observado en los linfocitos OTI en contacto con esferoides de células resistentes a inmunoterapia.



**Figura 10: El contacto de Células OTI PD-1<sup>-/-</sup> con esferoides tumorales de líneas resistentes a inmunoterapia induce un incremento de células precursoras exhaustas** **A)** Células totales de ganglio linfático fueron obtenidas de ratones C57BL6 OTI CD45.1 PD-1<sup>+/+</sup> o PD-1<sup>-/-</sup> y fueron co-cultivadas con esferoides tumorales de MO4 o esferoides generados de los cultivos primarios de tumores resistentes a inmunoterapia anti PD-1 (R1) durante 10 días. Posteriormente, las células fueron teñidas para su caracterización mediante citometría de flujo. **B)** Plots representativos para las poblaciones de agotamiento TCF1<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (T<sub>pe1</sub>), TCF1<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (T<sub>pe2</sub>), TCF1<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (T<sub>exint</sub>), TCF1<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (T<sub>exterm</sub>), en células OTI. **C)** Gráficos de barras para la cuantificación del % de células OTI que presentan los distintos fenotipos de agotamiento. **D)** Cuantificación de células CD8<sup>+</sup>Vb5.1<sup>+</sup>(OTI) en las distintas condiciones experimentales. En barras negras se muestran células OTI PD-1<sup>+/+</sup> y en barras grises células OTI PD-1<sup>-/-</sup> en las distintas condiciones experimentales. Resultados de un experimento independiente n=3 repeticiones por condición. ANOVA de 2 vías seguida de una prueba de Tukey con  $\alpha=0.05$ , \* P<0.05 y \*\* P<0.001.

## 7. DISCUSIÓN

La inmunoterapia dirigida al bloqueo de receptores de inhibición (ICB) ha logrado incrementar de manera sustancial la supervivencia a 6 años de pacientes con melanoma avanzado y recientemente ha sido aprobada para su uso en otras neoplasias en estadio avanzado<sup>42</sup>. Sin embargo, todavía no se utiliza en todos los pacientes y en particular en nuestra población debido a 2 razones fundamentales: la primera es el costo elevado de la terapia, que suele ser una combinación de anticuerpos anti-CTLA4 y anti-PD1, con un costo estimado en México muy superior a las terapias convencionales, la segunda es la alta proporción de pacientes que no responden al tratamiento o que desarrollan resistencia (más del 39%).

De tal forma que no es de sorprender que en todo el mundo se estén canalizando esfuerzos encaminados a describir y revertir los mecanismos asociados a la resistencia a inmunoterapia en cáncer. Sin embargo, estos esfuerzos requieren de investigación en prototipos animales, los cuales hasta el momento carecen de un sistema que permita modelar la resistencia a inmunoterapia, como lo pueden ser líneas celulares tumorales sensibles o resistentes a ICB.

Los hallazgos de este trabajo muestran que la inmunización de un adyuvante en conjunto con el antígeno OVA en ratones C57/BL6 con tumores formados de melanoma murino MO4, que expresa OVA, induce una presión selectiva sobre las células tumorales que repercute en la adquisición de mecanismos de resistencia a inmunoterapia anti-PD1. Los cuales se sustentan en una disminución en el infiltrado de linfocitos T CD8 agotados, terminales y precursores. Así mismo, las células tumorales de ratones resistentes a inmunoterapia pudieron establecerse como cultivos primarios en un modelo de esferoides tumorales *in vitro* los cuales pudieron recapitular las diferencias fenotípicas en la activación y agotamiento de linfocitos CD8 (OTI), caracterizadas principalmente por la acumulación de precursores T<sub>pex2</sub> con un compromiso en la proliferación, determinado por la expresión de Ki67 y en la función con una baja expresión de IFN- $\gamma$ . Este fenotipo no pudo revertirse con el uso de linfocitos OTI carentes del receptor de inhibición PD-1, demostrando que el compromiso funcional de los linfocitos OTI en contacto con células tumorales resistentes a inmunoterapia funge como mecanismo de evasión inmune y es independiente de la inhibición inducida por la vía PD-1/PDL-1. Sin embargo, este mecanismo adquirido por presión selectiva a través de la inmunización, retiene alguna interacción con la vía de PD-1, ya que la ausencia de este receptor (PD-1) en los linfocitos OTI influyó de manera importante en la acumulación de linfocitos OTI con fenotipo precursor.

Este trabajo recapitula por primera vez en un modelo *in vitro* la inducción de las distintas poblaciones de linfocitos T agotados recientemente reportadas por Beltra y colaboradores<sup>35</sup>, identificando también por primera ocasión el posible papel de cada una en la resistencia a inmunoterapia y evidenciando un posible mecanismo de resistencia asociado a un compromiso en la diferenciación de poblaciones precursoras con función y proliferación limitada que genera la ausencia de poblaciones intermedias y terminales funcionales.

Los resultados de este trabajo son relevantes, ya que con la presión selectiva ejercida con la inmunización de péptidos del modelo antigénico de OVA en conjunto con adyuvantes como son las porinas de *Salmonella typhi*, se ha podido generar una heterogeneidad tumoral derivada de dicha selección en una línea singénica de melanoma murino MO4. Esto es importante, ya que si bien las líneas celulares comparten el mismo genoma, es bien sabido que la alta tasa de replicación de las células tumorales, en conjunto con la inestabilidad genómica y la falta de elementos que corrijan errores en la transcripción de DNA<sup>43,44</sup>, hacen a las células más susceptibles a desarrollar mutaciones significativas que en el caso de la presión inmune ejercida en un contexto de inmunización puede desencadenar el desarrollo de mecanismos de evasión inmunitaria<sup>5,45</sup> que a su vez pudieran manifestarse y establecerse cuando se bloquean mecanismos de inhibición inmune como PD-1. Lo anterior evidenciado por el desarrollo de tumores resistentes a inmunoterapia anti-PD1 en una misma condición de inmunización (**Figura 3B**). Los resultados obtenidos en este contexto son relevantes, ya que se considera que los mecanismos de evasión se dan en etapas tempranas del desarrollo de las neoplasias<sup>5</sup>, sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo brindan evidencia que sugiere que la inmunoedición en el cáncer es un proceso continuo que se mantiene aun cuando las células tumorales escapan del control inmunitario.

Interesantemente, se encontró que la respuesta a inmunoterapia anti-PD-1 en dicho modelo de inmunización se asoció directamente con una disminución en el infiltrado de células CD8 en los tumores (**Figura 3C y 3D**). En trabajos previos de nuestra unidad de investigación<sup>40</sup>, así como en los resultados obtenidos del infiltrado de los tumores de ratones que fueron inmunizados con OVA y Porinas, se observó que se induce el reclutamiento de células CD8+ agotadas con fenotipo exhausto terminal y precursor. De tal forma que el decremento de células CD8+ en tumores resistentes sugiere que la resistencia puede estar asociada a un menor infiltrado de linfocitos T CD8+ posiblemente derivado de la falta de señales de sobrevivencia o a la presencia de señales de muerte como se ha reportado en otros trabajos<sup>39</sup>.

De igual forma, cabe la posibilidad que las células CD8 de tumores resistentes a inmunoterapia se encuentren en estadios terminales de agotamiento o senescencia y, por lo tanto, sean más susceptibles a la apoptosis<sup>20,46</sup>. Sin embargo, es posible que la poca abundancia de linfocitos T CD8+ en tumores resistentes a inmunoterapia está asociada a un compromiso en la diferenciación a poblaciones funcionales de agotamiento, como se discute más adelante.

A la fecha, es poco conocido como se modulan las poblaciones inmunitarias infiltrantes de tumor después de la inmunoterapia y cuál es la relación del fenotipo de estas poblaciones con la respuesta a ICB. Evidencia reciente señala que la población de linfocitos T CD8 infiltrantes de tumor con fenotipo agotado es la que responde preferencialmente a anti-PD1, particularmente una subpoblación conocida como progenitora exhausta Tpex, la cual da lugar a células efectoras agotadas Tex con funcionalidad atenuada pero no disfuncionales<sup>34</sup>.

Diversos autores han reportado que la respuesta positiva a inmunoterapia depende de la abundancia de Tpex, mientras que la resistencia se relacionaría directamente con el infiltrado de células exhaustas terminales TIM3+<sup>6,34</sup>. Esto podría ser explicado por un efecto re vigorizante de la terapia con anti-PD-1 sobre las células precursoras exhaustas, las cuales tendrían rondas de división asimétrica para generar más Tpex y diferenciarse a Tex. De tal manera que las diferencias observadas en la respuesta a ICB podrían asociarse a la abundancia de estas Tpex antes de la inmunoterapia, asociado al mismo tiempo a las señales del microambiente tumoral que puedan favorecer el mantenimiento de este fenotipo precursor. De igual manera, cada vez es más claro que la descripción de los fenotipos y función de las células exhaustas no puede limitarse a la expresión de PD-1 y TIM3 y que la expresión de estos marcadores sea un indicador determinante para asumir que es un fenotipo terminal no funcional de los linfocitos T infiltrantes de tumor.<sup>6</sup>

En contraste con lo anterior, los resultados de este trabajo mostraron que los tumores sensibles a inmunoterapia anti-PD1 (**Figura 4C**), se enriquecen en células CD8 TIM3+ PD1+ (Tex) mientras que en los tumores resistentes disminuye esta población (**Figura 4D y 4A**). Los resultados también demostraron que la abundancia de células TCF1+ PD-1+ (Tpex) incrementa en tumores sensibles a inmunoterapia y esta población es poco abundante en los tumores resistentes (**Figura 5C y 5D**) correlacionado con el incremento de Tex de la **Figura 4** en los tumores sensibles. Indicando que la presencia de ambas poblaciones es importante para la respuesta a la inmunoterapia, lo cual ha sido reportado en otros trabajos en donde los Tpex tienen una función limitada, pero son capaces de diferenciarse a poblaciones con fenotipo de agotamiento terminal Tex funcionales las cuales son importantes en el control del crecimiento tumoral<sup>34</sup>.

Interesantemente, se observó que la localización de TCF1 en los linfocitos T CD8 de tumores sensibles a anti-PD1, no co-localiza del todo con la marca nuclear, sugiriendo que se encuentra fuera de ese organelo celular (**Figura 5A y 5B**). Lo anterior es relevante, ya que hay reportes que indican que TCF1 puede tener al menos 2 isoformas, las cuales cumplen con funciones distintas. Se ha descrito que la forma corta de TCF1 en el núcleo cumple con función represora de la diferenciación y proliferación de las células y que esta isoforma carente del dominio de  $\beta$ -catenina se exporta a citoplasma en función de la activación de la vía de calmodulina<sup>47</sup>. Mientras que la isoforma larga de TCF1 se importa al núcleo y cumple con funciones asociadas al carácter troncal de las células.

Por lo que la presencia de este factor de transcripción en el citoplasma de las células agotadas infiltrantes de tumores sensibles a inmunoterapia podría sugerir que se trata de la isoforma corta de este factor y sugiere también que es la actividad de los genes que reprime dicha isoforma la que se relaciona con la respuesta a la inmunoterapia<sup>47</sup>. O bien que la resistencia a inmunoterapia podría estar relacionada con un bloqueo en la diferenciación de los linfocitos agotados a través de la isoforma corta de TCF1. Esto también podría explicar la ausencia de células CD8 en tumores resistentes, ya que al bloquearse la diferenciación y proliferación de las células agotadas precursoras (Tpex) esto se vería reflejado en una disminución de células CD8 agotadas (Tex o TexTerm) con potencial efector<sup>35</sup>. De tal forma que futuros trabajos podrían orientarse al estudio de la dinámica de ambas isoformas de TCF1 y su papel en la respuesta a inmunoterapia.

Es de resaltar que en los tumores de ratones que solo fueron inmunizados hay un incremento de células CD8 Tpex en comparación con el grupo control, sugiriendo que la inmunización previa a la inmunoterapia anti-PD1 pudiera ser una herramienta útil para enriquecer los tumores de células responsivas a ICB como se ha sugerido en otros estudios de nuestro grupo de investigación.<sup>40</sup>

Como un complemento del modelo *in vivo* se generaron estructuras tridimensionales tumorales (esferoides) las cuales se ha descrito como un componente clave en el estudio a fondo de los diversos mecanismos de resistencia que desarrollan las células tumorales a las terapias convencionales<sup>48</sup>. Este modelo, además de recapitular los mecanismos de resistencia observados en el modelo *in vivo*, es relevante para su posterior uso en el desarrollo preclínico de estrategias que reviertan la resistencia a inmunoterapia. Es importante mencionar que este es el primer modelo de esferoides a partir de células de melanoma murino.

Los resultados de este trabajo mostraron que las células de melanoma murino pueden formar esferoides con un radio promedio de 450 $\mu$ m muy superior a lo reportado y observado en los ensayos de este trabajo con esferoides generados a partir de la línea MCF7 (100 $\mu$ m) de cáncer de mama (**Figura 6B**) la cual es una de

las más utilizadas para la generación de esferoides debido a la importancia de dicha neoplasia a nivel mundial<sup>49-51</sup>.

Lo anterior también toma relevancia si se considera que la generación de estos esferoides no solo fue posible con el empleo de un medio de cultivo suplementado con el fin de inducir características troncales en las células tumorales y con ello aumentar la eficiencia de generación de esferoides (Mamocult) sino que también fue posible empleando un medio de uso convencional como DMEM. **(Figura 6A)** Se observó en las imágenes de microscopia y en la reconstrucción tridimensional que las estructuras obtenidas tienen una forma esferoidal **(Figura 6B y 6C)** que además puede estar en contacto con linfocitos T específicos para un antígeno modelo expresado en las células de melanoma (MO4). Los linfocitos T pueden penetrar dichos esferoides e inclusive expresar marcadores de agotamiento como PD-1 **(Figura 7B, 7C y 7D)**. Interesantemente, los resultados también mostraron que la expresión de PD-1 fue antígeno específica ya que solamente el co-cultivo de linfocitos OTI con células MO4 induce la expresión de dicha molécula contrario al contacto de linfocitos OTI con células MCF7 las cuales no expresan OVA y además son células humanas. Lo cual descarta una inducción de agotamiento asociada al microambiente tumoral generado por los esferoides. De tal modo, el modelo generado en este trabajo es adecuado para el estudio de los mecanismos de resistencia a inmunoterapia y posiblemente para la búsqueda de estrategias que reviertan dicha resistencia.

En este trabajo también se documentó que los esferoides generados a partir de líneas celulares de melanoma murino y células derivadas de tumores resistentes a inmunoterapia pueden inducir la activación y agotamiento de los linfocitos T CD8. En el caso particular del modelo utilizado se evaluaron linfocitos OTI con el fin de que reconocieran de manera eficiente el antígeno expresado por la línea celular MO4 (OVA) y las células resistentes derivadas de MO4. Se comprobó que el co-cultivo de esferoides con linfocitos OTI puede inducir la expresión de PD-1 la cual incrementa con el tiempo de cultivo. La expresión de PD-1 en células en contacto con esferoides tumorales es distinta respecto a las células estimuladas con una molécula utilizada normalmente para la activación de linfocitos T como PHA, en donde se puede observar que la expresión de PD-1 es baja y transitoria en comparación con la expresión sostenida observada en el caso del contacto tumoral **(Figura 8)**, lo anterior indica que el agotamiento de los linfocitos T es dependiente del tipo de estímulo y probablemente de la aidez de la señal de activación más que del tiempo de estimulación como han propuesto otros autores.<sup>29</sup>

Lo anterior también fue evidenciado por las diferencias en la cinética de expresión de CD69, considerado un marcador clásico de activación de linfocitos T, el cual tuvo una expresión transitoria en las células activadas con PHA desde el día 1 mientras que las estimuladas con los esferoides de MO4 no mostraron una expresión evidente de este marcador. **(Figura 8C y 8D)**.

También se observó que solamente los linfocitos OTI en contacto con esferoides de MO4 pudieron mantenerse vivos en cultivo por más de 7 días, ya que en las otras condiciones a partir del día 7 se observó muy comprometida la viabilidad y es por ello por lo que en el día 10 de la cinética de activación no se muestran resultados para el control sin estimular, ni para la activación con PHA. Lo cual sugiere que el contacto con las células tumorales también pueda brindar señales de supervivencia a los linfocitos OTI, pero no de diferenciación y proliferación, como lo sugieren tanto los resultados *in vitro* como los experimentos *in vivo*.

Por otra parte, el contacto de linfocitos OTI con esferoides de células R1 mostró diferencias en los fenotipos inducidos hasta el día 10 de la cinética, siendo las células con fenotipo T<sub>pex2</sub> y T<sub>extInt</sub>, las más abundantes cuando los linfocitos OTI estuvieron en contacto con esferoides de células R1. Mientras que el contacto con la línea parental mantuvo el estadio T<sub>extInt</sub> e indujo un bajo porcentaje de células T<sub>exterm</sub> y T<sub>exp2</sub>. (**Figura 9A y 9B**). Lo anterior adquiere relevancia si se considera que es la primera vez que se recapitulan las 4 poblaciones de agotamiento descritas por Beltra y colaboradores, en un modelo *in vitro*, las cuales se generaron mediante el co-cultivo de esferoides tumorales con linfocitos OTI, abriendo la posibilidad de explorar si existen diferencias en la generación de estas poblaciones en tumores tratados con inmunoterapia.

Adicionalmente, se encontró una capacidad proliferativa comprometida en los linfocitos OTI que estuvieron en contacto con los esferoides de líneas resistentes a inmunoterapia, ya que se observó en el ensayo cinético que la expresión de Ki67 en dichas células fue baja en los puntos cinéticos evaluados, estando en niveles comparables con el control sin estimular siendo a su vez un reflejo de la nula proliferación de las células (**Figura 9C**). Lo previamente mencionado contrasta con el incremento en la expresión de dicho marcador en las células en contacto con la línea parental MO4 al día 7, lo cual sugiere que hay un mecanismo intrínseco a las células tumorales resistentes que no permite que los linfocitos OTI se diferencien y proliferen de manera correcta. Dichos resultados suman evidencia a lo demostrado en las **Figuras 4 y 5** en donde se observó que los tumores resistentes a inmunoterapia se caracterizan por un bajo infiltrado de células T agotadas.

Cabe señalar que las células agotadas con fenotipo precursor T<sub>pex2</sub> se han descrito como las que menos carácter efector retienen de entre los fenotipos de agotamiento y es el que más se acumuló en el contacto con las líneas resistentes e interesantemente se encontró que los linfocitos OTI en contacto con esferoides de R1 inducen una población T<sub>pex2</sub> distinta a las T<sub>pex2</sub> encontradas en el contacto con MO4, las cuales expresan menor IFN $\gamma$  y, por lo tanto, son menos funcionales que su homólogo en contacto con MO4. (**Figura 9D,9E y 9F**).

De tal forma que estos datos también sugieren que el mecanismo de evasión del sistema inmune que conlleva la resistencia a inmunoterapia pudiera estar sostenido por una diferenciación preferencial hacia fenotipos de agotamiento con poca capacidad efectora como T<sub>pex2</sub>.<sup>35</sup> Dichos datos son comparables con el fenómeno observado *in vivo* en donde las células infiltrantes CD8 de tumores resistentes se caracterizaron por expresar marcadores de T<sub>pex</sub> y casi no se observaron células T<sub>ex</sub> terminales. Lo que sugiere que la acumulación de precursores en los linfocitos OTI cultivados con líneas resistentes pueda estar directamente relacionado con un bloqueo en la proliferación y diferenciación de los fenotipos de linfocitos T agotados y no en la inducción de la diferenciación terminal de estas células<sup>6,34,35</sup>.

De esta manera este trabajo no solo aporta el desarrollo de un modelo experimental para la generación de tumores resistentes a inmunoterapia anti-PD1 con el uso de adyuvantes como presión inmune, sino también adapta un modelo normalmente utilizado para evaluar características troncales en las células tumorales con el fin de usarlo para evidenciar los mecanismos moleculares asociados a la resistencia a inmunoterapia.<sup>52</sup>

Consecuente con lo observado en la disrupción de la diferenciación y proliferación de linfocitos OTI en contacto con esferoides de líneas resistentes a inmunoterapia, en este trabajo se abordó si dicho efecto podría mantenerse aun con la ausencia de PD-1. Lo anterior pudo realizarse con el uso de células OTI PD1<sup>-/-</sup> (PD-1KO) y células OTI PD1<sup>+/+</sup>.

Los resultados obtenidos demostraron que la acumulación de células precursoras se mantiene con la ausencia de la expresión de PD-1, ya que tanto en las células OTI PD-1KO como en las PD-1WT hubo una acumulación marcada de precursores cuando dichas células estuvieron en contacto con células resistentes a inmunoterapia, lo cual no sucedió con los linfocitos OTI, cultivados con la línea parental (**Figura 10B**). Interesantemente, los resultados sugieren que la ausencia de PD-1 en estas células impacta en la acumulación de los precursores T<sub>pex1</sub>, así como lo T<sub>pex2</sub>, indicando que la señalización de dicha molécula pudiera interferir de manera positiva en la diferenciación de las células agotadas. (**Figura 10C**).

Es de resaltar también los cambios observados en el contacto con la línea parental MO4 y los linfocitos OTI PD-1 KO, donde se pudo apreciar que la ausencia de PD-1 induce un incremento significativo en la diferenciación hacia T<sub>ex</sub>term, lo cual coincide con lo observado en la **Figura 5** donde se observa que el bloqueo de PD-1 induce un incremento de linfocitos T con fenotipo terminal, sumando evidencia que lleva a pensar que la respuesta a inmunoterapia depende de la diferenciación a fenotipos terminales de agotamiento. Sin embargo, es pertinente corroborar si los linfocitos T<sub>ex</sub>Term diferenciados en el contexto del bloqueo o ausencia de PD-1 tienen la misma funcionalidad que los diferenciados sin el bloqueo de dicha molécula.

La evidencia de este trabajo también demostró que las diferencias en la abundancia de los fenotipos de agotamiento, afectan de manera importante en la abundancia de linfocitos OTI después de 10 días de co-cultivo con esferoides tumorales (**Figura 10D**), fue evidente que el contacto con células parentales mantiene elevados los números de linfocitos OTI WT PD-1 y dichos números incrementan en ausencia de la señalización de PD-1, como un probable efecto sobre la proliferación, análogo a lo que sucede con las células T cuando es bloqueado PD-1 *in vivo*.<sup>23,53</sup> En los resultados obtenidos en el contacto con células resistentes a inmunoterapia es también evidente que dicho mecanismo de resistencia afecta a la supervivencia de los linfocitos T dado que los números de estas células no son recuperados con la ausencia de PD-1, señalando que el mecanismo asociado a la resistencia a inmunoterapia anti PD-1 conlleva un bloqueo robusto en la diferenciación y proliferación de los linfocitos T.

En general los resultados obtenidos en este trabajo brindan evidencia que sugiere que el mecanismo responsable del fallo de las estrategias inmunoterapéuticas puede depender de un bloqueo en las señales que llevan a los linfocitos T agotados a proliferar y a diferenciarse a poblaciones funcionales. Lo anterior probablemente asociado a la señalización de otras moléculas inhibitorias que se ha descrito también pueden ser expresadas por los linfocitos T agotados como TIGIT o LAG3<sup>54,55</sup>, de hecho la combinación del bloqueo de PD-1 junto con dichas moléculas ha demostrado incrementar la eficiencia de la inmunoterapia.

Por otro lado, los resultados también llevan a pensar que el mecanismo de resistencia a inmunoterapia desarrollado por las células tumorales pueda estar asociado a la expresión de factores solubles que afecten diferenciación y proliferación de linfocitos, como lo pueden ser ligandos de la vía de WNT/ $\beta$ catenina los cuales pueden activar programas transcripcionales que llevan al bloqueo de la diferenciación de las células T.<sup>56</sup> Sumado a esto, trabajos recientes también han sugerido que la ausencia de linfocitos T agotados con carácter efector, correlaciona con la resistencia a inmunoterapia en cáncer de pulmón<sup>57</sup>, lo cual de manera paralela sustenta los resultados mostrados en este trabajo.

El estudio de los mecanismos de resistencia a inmunoterapia ha tenido un gran impacto en el estudio de la biología de los linfocitos T y en particular de los linfocitos T agotados, de los cuales se ha ido revirtiendo la noción de disfuncionalidad y sosteniendo de manera más robusta, que el agotamiento de estos linfocitos no es más que un estado de diferenciación alterno acotado a la naturaleza del reto antigénico y no tanto a la cronicidad del estímulo. Así mismo, resalta el papel de la interacción de las células inmunitarias con las células tumorales que tiene como consecuencia el desarrollo de nuevos mecanismos de evasión inmunitaria que pueden afectar la respuesta a fármacos inmunoterapéuticos, los cuales también podrían ejercer presión selectiva sobre las células tumorales y hacerlas cada vez más aptas para evadir la respuesta inmune. De tal forma que las estrategias para

mejorar la respuesta a la inmunoterapia también deberían considerar inhibir la actividad de las células tumorales y así evitar la inmunoedición.

Por último, también resalta la adaptabilidad del modelo de generación de esferoides en este trabajo, en donde pudo ser posible demostrar diferencias intrínsecas en el contacto de las células tumorales con las células T que pueden determinar la resistencia a inmunoterapia, las cuales también pudieron ser recapituladas en el modelo *in vivo*.

Lo anterior expone la obtención de un modelo integral de estudio de mecanismos de resistencia a inmunoterapia adquiridos en el contexto de la complejidad tumoral de un modelo *in vivo* y develados por la simplicidad y versatilidad de un modelo *in vitro*; por lo que resta desarrollar el máximo potencial del modelo obtenido con el fin de caracterizar a fondo la resistencia a inmunoterapia y así desarrollar estrategias para revertir este fenómeno.

## 8.CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### 8.1 CONCLUSIONES

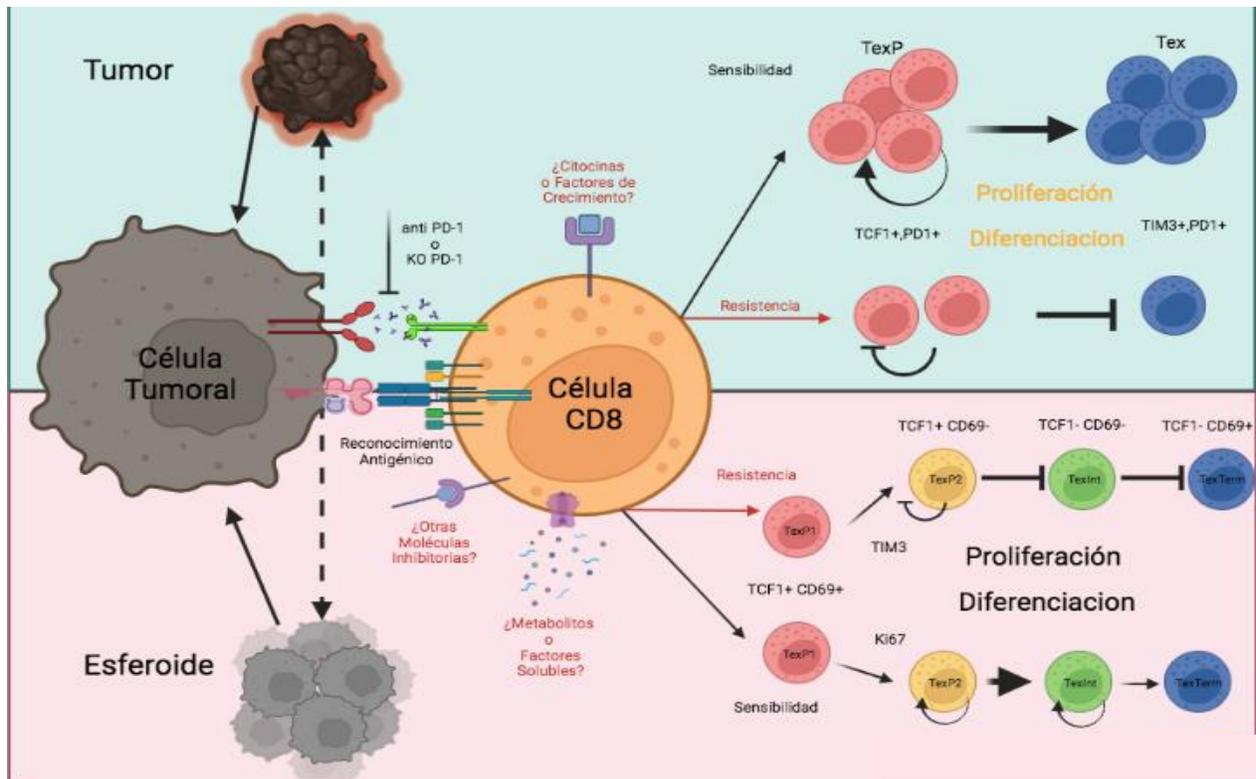
Las evidencias presentadas en este trabajo aportan elementos para concluir lo siguiente:

- La presión inmunitaria generada por la inmunización con adyuvantes induce la adquisición de mecanismos de evasión inmune que impactan en la resistencia a inmunoterapia anti-PD-1 y las células tumorales recuperadas de ese contexto de evasión pueden derivarse para obtener líneas celulares resistentes a inmunoterapia.
- El fenotipo de las células CD8 asociadas a la respuesta a inmunoterapia es una mezcla entre precursores agotados (T<sub>pex</sub>) y células agotadas terminales (T<sub>ex</sub>), mientras que los tumores resistentes a inmunoterapia carecen de células con fenotipo terminal y tienen predominantemente células precursoras, pero en mucho menor medida que los tumores sensibles.
- El mecanismo por el cual hay menos células CD8 en tumores o esferoides resistentes a inmunoterapia se asocia con un bloqueo en la diferenciación de las células agotadas precursoras hacia células terminales efectoras, lo cual se asocia con una expresión comprometida de Ki67 e IFN $\gamma$ . Lo cual impacta en la función y proliferación de los linfocitos T agotados.
- El posible mecanismo de resistencia a inmunoterapia que compromete la proliferación y función de los linfocitos T agotados no puede revertirse eliminando la vía de PD-1/PD-L1, sugiriendo que este es independiente a dicha vía de inhibición de linfocitos T.
- Lo anterior fue determinado en su mayoría mediante la recreación *in vitro* del contacto entre células tumorales e inmunes con el uso de estructuras tumorales tridimensionales, lo cual también tuvo un sustento en los datos obtenidos en el modelo *in vivo*.

### 8.2 PERSPECTIVAS

Los resultados presentados en este trabajo dejan también una amplia gamma de preguntas que pueden ser abordadas en trabajos posteriores. Tal es el caso del mecanismo que genera compromiso de la diferenciación y proliferación de los linfocitos agotados en contacto con células resistentes a inmunoterapia. Estudios recientes han señalado que el compromiso funcional de los linfocitos T CD8 infiltrantes en tumores de cáncer renal se asocia a la sobre expresión de componentes de la vía de WNT/ $\beta$ catenina por parte de las células tumorales<sup>56</sup>, por lo que resultaría interesante explorar si hay una disrupción de esta vía en el modelo presentado.

Además, el modelo de esferoides generado permite evaluar todas las vías previamente sugeridas como relevantes en la respuesta a inmunoterapia, ya que en comparación con los modelos in vivo de implantación de tumor y bloqueo de PD-1, el co-cultivo de esferoides con células inmunitarias resulta más asequible y práctico en cuestión de tiempo, costos, variaciones experimentales y tamaño de muestra. En este mismo sentido, dicho modelo generado abre la posibilidad de extrapolarlo a otras neoplasias e inclusive a su uso con células humanas. Sumado a lo anterior, una vez caracterizadas las vías por las cuales se establece la resistencia a inmunoterapia, el modelo de esferoides puede tener un gran impacto en el desarrollo de estrategias que ayuden a revertir dichos mecanismos de resistencia. Por otro lado, se ha descrito previamente que las células dendríticas, en conjunto con las células CD4, juegan un papel muy importante en el mantenimiento y diferenciación de las células CD8 agotadas y que la formación de nichos intra tumorales donde participan estas 3 células puede ser determinante en el progreso de la neoplasia, por lo que resulta también relevante determinar la relación de los fenotipos de estas 3 poblaciones con la resistencia a inmunoterapia.

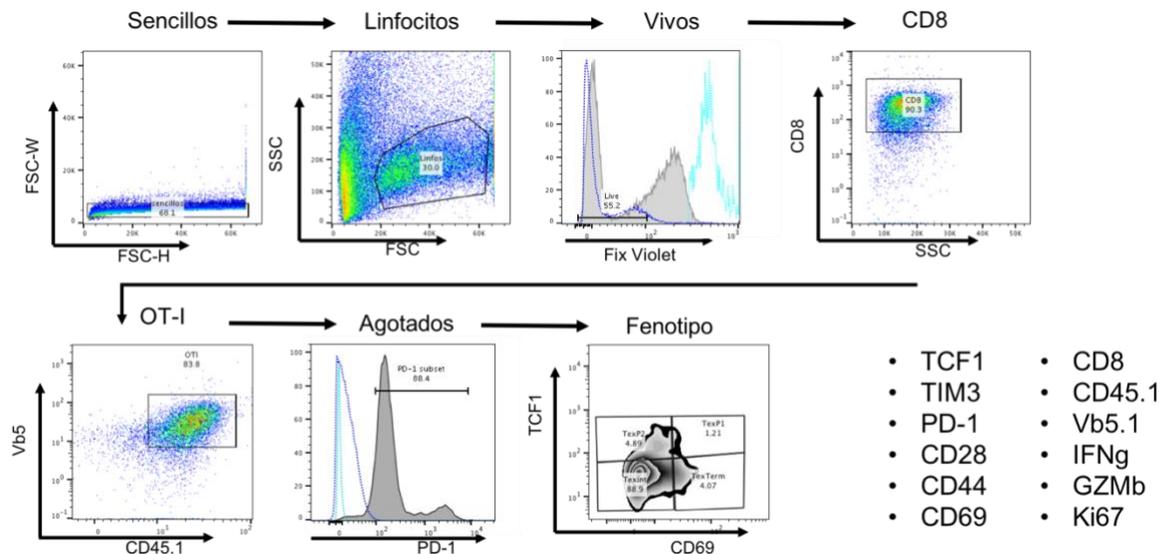


**Figura 11: Modelo propuesto para la resistencia a inmunoterapia anti PD-1:** Los resultados de este trabajo permiten proponer que la resistencia a inmunoterapia puede estar asociada a un bloqueo en la proliferación, diferenciación y función (IFN $\gamma$ ) de las células T precursoras agotadas en particular las T<sub>pex2</sub>. Este bloqueo en la diferenciación se vio reflejado en la poca abundancia de linfocitos OT1 en contacto con esferoides de células resistentes a inmunoterapia. Lo anterior podría explicar la ausencia de linfocitos T CD8

observada en los tumores resistentes a inmunoterapia. Interesantemente, el contacto de esferoides de células resistentes a inmunoterapia con linfocitos OTI deficientes de PD-1 no logró revertir el compromiso en la diferenciación de las células T<sub>pex2</sub>, sugiriendo que el mecanismo de resistencia desarrollado es independiente de la función inhibitoria de la vía PD-1/PD-L1, pero de forma interesante este mecanismo de resistencia adquirido por la presión inmune como presión selectiva posee interacción con la función de PD-1, ya que la ausencia de este acentuó la acumulación de precursores agotados. Estos resultados dejan como (plantean) interrogante de qué señales a nivel celular pueden comprometer en la diferenciación o proliferación y de qué manera podrían revertirse. Figura Creada en Biorender.com

## 9. ANEXO

### ESTRATEGIA DE ANÁLISIS DE CITOMETRÍA



**Figura 12: Estrategia de análisis de datos de citometría:** Se eliminaron las partículas agregadas en dobletes utilizando el ancho y alto del parámetro Forward (FSC-W y FSC-H) para obtener eventos sencillos, los cuales se caracterizaron como linfocitos en función de su tamaño y complejidad (FSC y SSC) con el fin de eliminar partículas pequeñas como debris o células tumorales, de este gate se obtuvieron las células vivas en función de la fluorescencia negativa del colorante de viabilidad Fix violet (en Cyan se observa el histograma del control positivo, en azul cielo el histograma del control sin teñir y en gris el histograma de la muestra). Posteriormente, se seleccionaron las células CD8+ y de ellas en función de la co-expresión de Vb5.1 y CD45.1 se seleccionaron las células OTI, a las cuales en función de la expresión media y alta de PD-1 se caracterizaron como agotadas (en Cyan se observa el control sin teñir, en azul el FMO para PD-1 y en gris el histograma de la muestra), finalmente dichas células fueron caracterizadas como "T<sub>pex1</sub>", "T<sub>pex2</sub>", "T<sub>extInt</sub>" y "T<sub>extTerm</sub>" en función de la expresión de TCF1 y CD69. La cuantificación de IMF de los marcadores restantes se realizó a partir de las células "OTI agotadas"

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Cancer. <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/cancer>.
2. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 - The Lancet. [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(16\)31679-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(16)31679-8/fulltext).
3. Global Cancer Observatory. <http://gco.iarc.fr/>.
4. Miller, A. J. & Mihm, M. C. Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **355**, 51–65 (2006).
5. Aris, M., Barrio, M. M. & Mordoh, J. Lessons from Cancer Immunoediting in Cutaneous Melanoma. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 1–14 (2012).
6. Gide, T. N. *et al.* Distinct Immune Cell Populations Define Response to Anti-PD-1 Monotherapy and Anti-PD-1/Anti-CTLA-4 Combined Therapy. *Cancer Cell* **35**, 238-255.e6 (2019).
7. Ren, D. *et al.* Predictive biomarkers and mechanisms underlying resistance to PD1/PD-L1 blockade cancer immunotherapy. *Mol. Cancer* **19**, 19 (2020).
8. Lund, A. W. *et al.* Lymphatic vessels regulate immune microenvironments in human and murine melanoma. *J. Clin. Invest.* **126**, 3389–3402 (2016).
9. Pitcovski, J., Shahar, E., Aizenshtein, E. & Gorodetsky, R. Melanoma antigens and related immunological markers. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **115**, 36–49 (2017).
10. Liu, J. *et al.* An Integrated TCGA Pan-Cancer Clinical Data Resource to Drive High-Quality Survival Outcome Analytics. *Cell* **173**, 400-416.e11 (2018).
11. Burnet, F. M. Immunological Surveillance in Neoplasia. *Immunol. Rev.* **7**, 3–25 (1971).
12. Adam, J., Yang, M., Soga, T. & Pollard, P. J. Rare insights into cancer biology. *Oncogene* **33**, 2547–2556 (2014).
13. Bindea, G. *et al.* Spatiotemporal Dynamics of Intratumoral Immune Cells Reveal the Immune Landscape in Human Cancer. *Immunity* **39**, 782–795 (2013).
14. Turning Cold into Hot: Firing up the Tumor Microenvironment: Trends in Cancer. [https://www.cell.com/trends/cancer/fulltext/S2405-8033\(20\)30083-2](https://www.cell.com/trends/cancer/fulltext/S2405-8033(20)30083-2).
15. Galon, J. & Bruni, D. Tumor Immunology and Tumor Evolution: Intertwined Histories. *Immunity* **52**, 55–81 (2020).
16. Palucka, A. K. & Coussens, L. M. The Basis of Oncoimmunology. *Cell* **164**, 1233–1247 (2016).
17. Mantovani, A. The inflammation – cancer connection. *FEBS J.* **285**, 638–640 (2018).
18. Kalaora, S. *et al.* Combined Analysis of Antigen Presentation and T-cell Recognition Reveals Restricted Immune Responses in Melanoma. *Cancer Discov.* **8**, 1366–1375 (2018).
19. Swann, J. B. & Smyth, M. J. Immune surveillance of tumors. *J. Clin. Invest.* **117**, 1137–1146 (2007).
20. Pitt, J. M. *et al.* Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors. *Immunity* **44**, 1255–1269 (2016).
21. León-Letelier, R. A., Bonifaz, L. C. & Fuentes-Pananá, E. M.OMIC signatures to understand cancer immunosurveillance and immunoediting: Melanoma and immune cells

- interplay in immunotherapy. *J. Leukoc. Biol.* **105**, 915–933 (2019).
22. Fares, C. M., Van Allen, E. M., Drake, C. G., Allison, J. P. & Hu-Lieskovan, S. Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade: Why Does Checkpoint Inhibitor Immunotherapy Not Work for All Patients? *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* 147–164 (2019) doi:10.1200/EDBK\_240837.
  23. Wei, S. C. *et al.* Combination anti-CTLA-4 plus anti-PD-1 checkpoint blockade utilizes cellular mechanisms partially distinct from monotherapies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 22699–22709 (2019).
  24. Pai, C.-C. S. *et al.* Tumor-conditional anti-CTLA4 uncouples antitumor efficacy from immunotherapy-related toxicity. *J. Clin. Invest.* **129**, 349–363.
  25. Wei, S. C., Duffy, C. R. & Allison, J. P. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov.* **8**, 1069–1086 (2018).
  26. Ouyang, Z. *et al.* Regulatory T cells in the immunotherapy of melanoma. *Tumor Biol.* **37**, 77–85 (2016).
  27. Keir, M. E. *et al.* Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J. Exp. Med.* **203**, 883–895 (2006).
  28. Curran, M. A., Montalvo, W., Yagita, H. & Allison, J. P. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 4275–4280 (2010).
  29. Wherry, E. J. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* **12**, 492–499 (2011).
  30. Antigen cross-presentation in young tumor-bearing hosts promotes CD8+ T cell terminal differentiation. <https://www.science.org/doi/10.1126/sciimmunol.abf6136>.
  31. Baitsch, L. *et al.* Exhaustion of tumor-specific CD8+ T cells in metastases from melanoma patients. *J. Clin. Invest.* **121**, 2350–2360 (2011).
  32. Kallies, A., Zehn, D. & Utzschneider, D. T. Precursor exhausted T cells: key to successful immunotherapy? *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 128–136 (2020).
  33. Im, S. J. *et al.* Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature* **537**, 417–421 (2016).
  34. Miller, B. C. *et al.* Subsets of exhausted CD8+ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat. Immunol.* **20**, 326–336 (2019).
  35. Beltra, J.-C. *et al.* Developmental Relationships of Four Exhausted CD8+ T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms. *Immunity* **52**, 825-841.e8 (2020).
  36. Zhao, X., Shan, Q. & Xue, H.-H. TCF1 in T cell immunity: a broadened frontier. *Nat. Rev. Immunol.* (2021) doi:10.1038/s41577-021-00563-6.
  37. LaFleur, M. W. *et al.* PTPN2 regulates the generation of exhausted CD8+ T cell subpopulations and restrains tumor immunity. *Nat. Immunol.* **20**, 1335–1347 (2019).
  38. Chu, T. & Zehn, D. Charting the Roadmap of T Cell Exhaustion. *Immunity* **52**, 724–726 (2020).
  39. Canale, F. P. *et al.* CD39 Expression Defines Cell Exhaustion in Tumor-Infiltrating CD8+ T Cells. *Cancer Res.* **78**, 115–128 (2018).
  40. León-Letelier, R. A. *et al.* Induction of Progenitor Exhausted Tissue-Resident Memory CD8+ T Cells Upon Salmonella Typhi Porins Adjuvant Immunization Correlates With Melanoma Control and Anti-PD-1 Immunotherapy Cooperation. *Front. Immunol.* **11**,

583382 (2020).

41. Siddiqui, I. *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* **50**, 195-211.e10 (2019).
42. Wolchok, J. D. *et al.* CheckMate 067: 6.5-year outcomes in patients (pts) with advanced melanoma. *J. Clin. Oncol.* **39**, 9506–9506 (2021).
43. Kaufmann, W. K. *et al.* Mechanisms of chromosomal instability in melanoma. *Environ. Mol. Mutagen.* **55**, 457–471 (2014).
44. Okamoto, T. *et al.* Clinical Significance of DNA Damage Response Factors and Chromosomal Instability in Primary Lung Adenocarcinoma. *Anticancer Res.* **37**, 1729–1735 (2017).
45. O’Donnell, J. S., Teng, M. W. L. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **16**, 151–167 (2019).
46. Jerby-Arnon, L. *et al.* A Cancer Cell Program Promotes T Cell Exclusion and Resistance to Checkpoint Blockade. *Cell* **175**, 984-997.e24 (2018).
47. Najdi, R. *et al.* A Wnt kinase network alters nuclear localization of TCF-1 in colon cancer. *Oncogene* **28**, 4133–4146 (2009).
48. Klicks, J., Maßlo, C., Kluth, A., Rudolf, R. & Hafner, M. A novel spheroid-based co-culture model mimics loss of keratinocyte differentiation, melanoma cell invasion, and drug-induced selection of ABCB5-expressing cells. *BMC Cancer* **19**, 402 (2019).
49. DeSantis, C., Siegel, R., Bandi, P. & Jemal, A. Breast cancer statistics, 2011. *CA. Cancer J. Clin.* **61**, 409–418 (2011).
50. M Braden, A., V Stankowski, R., M Engel, J. & A Onitilo, A. Breast cancer biomarkers: risk assessment, diagnosis, prognosis, prediction of treatment efficacy and toxicity, and recurrence. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 4879–4898 (2014).
51. Pulze, L. *et al.* MCF7 Spheroid Development: New Insight about Spatio/Temporal Arrangements of TNTs, Amyloid Fibrils, Cell Connections, and Cellular Bridges. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 5400 (2020).
52. Hasse, S., Meder, T., Freund, E., von Woedtke, T. & Bekeschus, S. Plasma Treatment Limits Human Melanoma Spheroid Growth and Metastasis Independent of the Ambient Gas Composition. *Cancers* **12**, 2570 (2020).
53. Pauken, K. E. *et al.* Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *7*.
54. Andrews, L. P., Marciscano, A. E., Drake, C. G. & Vignali, D. A. A. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. *Immunol. Rev.* **276**, 80–96 (2017).
55. Chauvin, J.-M. & Zarour, H. M. TIGIT in cancer immunotherapy. *J. Immunother. Cancer* **8**, e000957 (2020).
56. Takeuchi, Y. *et al.* Highly immunogenic cancer cells require activation of the WNT pathway for immunological escape. *Sci. Immunol.* **6**, eabc6424.
57. Lack of CD8+ T cell effector differentiation during priming mediates checkpoint blockade resistance in non–small cell lung cancer. <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/sciimmunol.abi8800>.