



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

EVALUACIÓN DE POBLACIONES DE LINFOCITOS T Y CÉLULAS DENDRÍTICAS

EN EL INFILTRADO TUMORAL DE PACIENTES CON MELANOMA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

QFB. DE LEÓN RODRÍGUEZ SARAÍ GISEL

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM,

COMITÉ TUTOR: DRA. PAULA LICONA LIMÓN
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM
DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO
CIBIOR, IMSS

CIUDAD UNIVERSITARIA, Cd. Mx., AGOSTO, 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

EVALUACIÓN DE POBLACIONES DE LINFOCITOS T Y CÉLULAS DENDRÍTICAS

EN EL INFILTRADO TUMORAL DE PACIENTES CON MELANOMA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

QFB. DE LEÓN RODRÍGUEZ SARAÍ GISEL

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM,

COMITÉ TUTOR: DRA. PAULA LICONA LIMÓN
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM
DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO
CIBIOR, IMSS

CIUDAD UNIVERSITARIA, Cd. Mx., 2022

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/741/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **20 de junio de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **DE LEÓN RODRÍGUEZ SARAÍ GISEL** con número de cuenta **313320411** con la tesis titulada **“EVALUACIÓN DE POBLACIONES DE LINFOCITOS T Y CÉLULAS DENDRÍTICAS EN EL INFILTRADO TUMORAL DE PACIENTES CON MELANOMA”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER
Vocal: DR. JOSÉ LUIS MARAVILLAS MONTERO
Vocal: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
Vocal: DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
Secretario: DRA. PAULA LICONA LIMÓN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 17 de agosto de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Primeramente, al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por ser un posgrado de excelencia, interesado en formar maestros capaces, con pensamiento crítico y humano. Gracias por darme la oportunidad de pertenecer a tan distinguido programa

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por darme el apoyo necesario para continuar mis estudios, 1084890.

A mi tutor principal, la **Dra. Laura Bonifaz** quien ha sido una guía y admiración para mí, me ha impulsado a ir más allá de lo que alguna vez pensé que podría alcanzar, ser rigurosa y de excelencia.

A mi comité tutor, la Dra. Rosana Pelayo Camacho y la Dra. Paula Licona Limón por sus comentarios que siempre fueron acertados, sus ideas que enriquecieron el proyecto en gran manera y por ser excelentes y brillantes.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

Gracias a mi mamá, quien ha dado todo de sí misma por mí, me ha cuidado, protegido e impulsado, este logro también es tuyo.

A mi hermano Uriel, por escucharme, soportar mis risas y mandarme a dormir cuando estaba muy cansada.

A mi abuelita Lucy, por ser mi hogar y mi segunda mamá.

A mi padre Jorge, por apoyarme y escucharme hablar de ciencia cada que nos veíamos.

A mi esposo David quien siempre ha creído en mí, me ha impulsado y ha enriquecido no sólo este trabajo sino mi vida, te amo.

A mis compañeros de laboratorio, Brenda, Iván, Lupita, Eli, Octavio y Araceli y de forma especial a Cristina que ha sido una maestra y amiga, un gran apoyo y guía para que este proyecto crezca.

A las instituciones que han financiado el proyecto CONACyT-PRONACES 302962 e Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), R-2019-785-051 FIS/IMSS/PROT/PRI0/19/125

A Él sea la gloria. Romanos 11:36

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.

LISTA DE ABREVIATURAS

I.	RESUMEN.....	1
II.	ABSTRACT	2
III.	ANTECEDENTES	3
	INCIDENCIA Y MORTALIDAD DEL MELANOMA	3
	CLASIFICACIÓN Y TIPOS DE MELANOMA.....	4
	ESTADIFICACIÓN Y TRATAMIENTO DEL MELANOMA.....	5
	RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN MELANOMA.....	7
	LINFOCITOS T, MEMORIA Y AGOTAMIENTO	7
	CELULAS DENDRÍTICAS	9
	INTELIGENCIA ARTIFICIAL PARA EL ANÁLISIS DE POBLACIONES INMUNES	10
IV.	OBJETIVO GENERAL.....	11
VI.	HIPOTESIS	11
VII.	METODOLOGIA	12
VIII.	RESULTADOS.....	15
	Características clínicas de la cohorte de estudio.....	15
	Análisis de la histología de pacientes con melanoma acral y cutáneo.....	18
	Evaluación de linfocitos T presentes en el infiltrado tumoral de melanoma.....	21
	Evaluación de diferentes fenotipos de linfocitos CD8 y su relación con el control de la enfermedad.....	23
	Fenotipo de residencia de tejido en la población de interés.....	26
	Evaluación de memoria y agotamiento en linfocitos T CD8 residentes de tejido.....	27
	Evaluación de funcionalidad de linfocitos T CD8 residentes de tejido.....	29
	Relación de linfocitos CD8 con variables clínicas.....	31
	Evaluación de abundancia y densidad de cDC1 en el infiltrado tumoral de melanoma.....	32
	Presencia de células dendríticas clásicas tipo 1 en ganglios centinelas de pacientes con melanoma.....	34
	Fenotipo de células dendríticas clásicas tipo 1 en infiltrado de pacientes con melanoma.....	35
	Perfiles específicos de cDC1 relacionados al control del melanoma.....	37
	Relación entre linfocitos CD8 CD103 TCF7 y cDC1	41
	Distribución de la población CD8 CD103 TCF7 en el tejido.....	42

Localización e interacción de linfocitos CD8 CD103 TCF7 y cDC1 en sitio tumoral.	44
IX. DISCUSIÓN.....	46
X. CONCLUSIONES.....	52
XI. PERSPECTIVAS	53
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metodología de análisis basada en Machine-Learning.....	14
Figura 2. Características de la población de estudio.....	16
Figura 3. Diferencias histológicas entre melanoma cutáneo y acral	19
Figura 4. Histología cutánea de pacientes con melanoma.	20
Figura 5. Linfocitos CD8 en el infiltrado de pacientes con melanoma no se relacionan al control de la enfermedad.....	22
Figura 6. Linfocitos CD8 que expresan TCF7 y CD103 son el fenotipo de mayor importancia.	24
Figura 7. Linfocitos CD8 residentes de tejido que expresan TCF-7 se asocian con el control de melanoma.	25
Figura 8. Linfocitos CD8 TCF7 CD103 expresan marcadores asociados a la residencia de tejido en un paciente libre de enfermedad.....	26
Figura 9. Linfocitos CD8 residentes de tejido que expresan TCF-7 y expresan marcadores de memoria agotada.....	28
Figura 10. Linfocitos CD8 residentes de tejido que expresan TCF-7 expresan marcadores de agotamiento.....	28
Figura 11. Linfocitos CD8 residentes de tejido que expresan TCF7 podrían ser una población agotada con características de función en pacientes libres de enfermedad.....	30
Figura 12. Relación entre la población CD8 TCF7 CD103 con el índice de Breslow	31
Figura 13. Mayor abundancia de cDC1 se relaciona con el control de la enfermedad.	33
Figura 14. Mayor abundancia de cDC1 en ganglio linfático drenante se relaciona con el control de la enfermedad.....	34
Figura 15. Fenotipo activador e inhibidor de las células dendríticas clásicas tipo 1 se encuentra incrementado en los pacientes libres de enfermedad.	36
Figura 16. Células dendríticas clásicas tipo 1 expresan CD40 y PD-L1.....	38
Figura 17. Las cDC1 presentes en el infiltrado tumoral tienen un fenotipo predominantemente activador en pacientes libres de la enfermedad.....	40
Figura 18. Relación entre células dendríticas clásicas tipo 1 y linfocitos T CD8 residentes de tejido que expresan TCF7	41
Figura 19. Linfocitos CD8 residentes de tejido que expresan TCF-7 se encuentran en agrupaciones en pacientes libres de enfermedad.....	43
Figura 20. Los linfocitos CD8 residentes de tejido TCF7 y las cDC1 se encuentran en estrecha relación en áreas cercanas al tumor	46
Figura 21. Linfocitos CD8 CD103 TCF7 y cDC1 y su papel en el control del melanoma	53

LISTA DE ABREVIATURAS

cDC1 conventional type 1 dendritic cells

HLA-DR Human Leukocyte Antigen

HE Hematoxilina & Eosina

mIF multiplexed Immunofluorescence

MI metasásico inicial

EM evolución a metástasis

LE Libre de enfermedad

IFN- γ interferón gamma

TOX Thymocyte selection-associated high mobility group box

TIM-3 T cell immunoglobulin and mucin domain-3

Trm Tissue resident memory

TNM Tumor Nodule Metastasis

I. RESUMEN

El melanoma es una malignidad que deriva de los melanocitos, las células encargadas de producir pigmentación en la piel. Dentro de los diferentes tipos de cáncer de piel, el melanoma es considerado el más agresivo con más del 60% de las muertes. Pese a los esfuerzos realizados para mejorar el pronóstico de la enfermedad, la supervivencia a 5 años etapa IV es de menos del 25% en caso de invasión a órganos¹. La incidencia del melanoma en México ha tenido un incremento de 500%; se prevé que esta tasa va en aumento. La respuesta inmune y el estudio de ésta en el contexto tumoral es crucial para entender los elementos involucrados en el control de la enfermedad. Entre los diferentes componentes del sistema inmune, los linfocitos T CD8 residentes de tejido (Trm) han evidenciado ser relevantes en la respuesta frente a tumores sólidos, gracias a su capacidad de responder rápidamente y promover el control tumoral a largo plazo. Las células dendríticas clásicas tipo 1 (cDC1) son el subtipo de DC más eficientes realizando presentación cruzada y por lo tanto activando a linfocitos T CD8 por lo que estudiar a estas dos poblaciones puede ser de importancia en melanoma. Adicionalmente en nuestro país existe predominio de melanoma acral, una forma rara en poblaciones caucásicas (54%, México vs 2%, E.U.) sin conocerse si existen diferencias en abundancia y fenotipo a nivel inmune entre este tipo de melanoma y el cutáneo². Esto destaca la importancia de estudiar a esta enfermedad en población mexicana. En el presente trabajo se logró observar que a pesar de las diferencias genéticas e histológicas que el melanoma acral y cutáneo presentan, a nivel de infiltrado inmune muestran un comportamiento similar. Además, se encontró una población de linfocitos CD8 que expresan CD103 y el factor de transcripción 7 (TCF-7) la cual se encuentra en mayor abundancia en pacientes libres de enfermedad, comparado a aquellos que desarrollan o tienen metástasis. Se logró evidenciar que esta población expresa marcadores asociados a la residencia de tejido como Hobit, Runx3, CD69, que expresa marcadores de agotamiento como PD-1, TOX y que es poco proliferativa pero funcional por la producción de IFN- γ . Se encontró que las cDC1 se encuentran más representadas en los pacientes que

muestran un control de la enfermedad comparado con los que presentan metástasis. Se observó en los pacientes libres de enfermedad dos poblaciones de cDC1 una CD40+ PD-L1+ y otra CD40- PD-L1+ cuyo fenotipo es predominantemente activador CD86+ IL-12+ IDO-, comparado a los pacientes metastásicos donde aunado a la poca abundancia de estas células la mayoría tienen un fenotipo regulador. Finalmente se logró evidenciar que mayor abundancia de las cDC1 y CD8 CD103 TCF-7 se relacionan de forma positiva, estos a su vez, correlacionan con un menor índice de Breslow, uno de los factores más utilizados en la clínica para evaluar la invasividad del melanoma y que estas dos poblaciones se encuentran en estrecha relación espacial en áreas organizadas cerca del tumor en los pacientes que controlan la enfermedad.

II. ABSTRACT

Melanoma is a malignancy that derives from melanocytes, the cells responsible for producing pigmentation in the skin. Among the different types of skin cancer, melanoma is considered the most aggressive, accounting for more than 60% of deaths. Despite the efforts made to improve the prognosis of the disease, survival at 5 years stage IV is less than 25% in case of organ invasion. The incidence of melanoma in Mexico has increased by 500%; this rate is expected to increase. The immune response and its study in the tumor context is crucial to understanding the elements involved in the control of the disease. Among the different components of the immune system, tissue-resident CD8 T lymphocytes (Trm) have been shown to be relevant in the response to solid tumors, thanks to their ability to respond rapidly and promote long-term tumor control. Classical dendritic cells type 1 (cDC1) are the most efficient DC subtype performing cross-presentation and therefore activating CD8 T lymphocytes, so studying these two populations may be of importance in melanoma. Additionally, in our country, there is a predominance of acral melanoma, a rare form in Caucasian populations (54%, Mexico vs 2%, U.S.A.) without knowing if there are differences in abundance and phenotype at the immune level between this type of melanoma and cutaneous melanoma. This highlights the importance of studying this disease in the Mexican population. In the present study it was observed

that despite the genetic and histological differences between acral and cutaneous melanoma at the level of immune infiltrate show a similar behavior. In addition, a group of CD8 lymphocytes expressing CD103 and transcription factor 7 (TCF-7) was found to be more abundant in disease-free patients, compared to those who develop or have metastases. It was evidenced that this population expresses markers associated with tissue residence such as Hobit, Runx3, CD69, that it expresses depletion markers such as PD-1, TOX and that it is not proliferative but functional due to the production of IFN- γ . We found that cDC1 are more represented in patients showing disease control compared to those with metastases. Two populations of cDC1 were observed in disease-free patients, one CD40+ PD-L1+ and the other CD40- PD-L1+ whose phenotype is predominantly activating CD86+ IL-12+ IDO-, compared to metastatic patients where, in addition to the low abundance of these cells, most of them have a regulatory phenotype. Finally, it was possible to demonstrate that a higher abundance of cDC1 and CD8 CD103 TCF-7 cells are positively related, these in turn correlate with a lower Breslow index, one of the most used factors in the clinic to evaluate the invasiveness of melanoma and that these two populations are found in close spatial relationship in organized areas near the tumor in patients who control the disease.

III. ANTECEDENTES

INCIDENCIA Y MORTALIDAD DEL MELANOMA

El melanoma es una neoplasia caracterizada por la proliferación masiva de los melanocitos, las células encargadas de la pigmentación en la piel a través de la producción de melanina. Dentro de los diferentes tipos de cáncer de piel, el melanoma es considerado el más agresivo, ya que a nivel mundial más del 60% de las muertes relacionadas a estos tipos de cáncer se deben a esta malignidad¹. La supervivencia a 5 años en etapas tempranas es de alrededor del 90%, sin embargo, a pesar de los distintos esfuerzos por aumentar la sobrevida, ésta se reduce a 64% cuando hay metástasis regionales y a menos del 25% cuando hay lesiones de melanoma distantes³.

La incidencia del melanoma varia a lo largo de todo el mundo, reportando la tasa más alta en Australia (40.3 por cada 100,000) y siendo la más baja en las zonas sur de Asia (0.5 por cada 100,000). En México el melanoma tiene una incidencia de 1.01 por cada 100,000, sin embargo, representa 80% de las muertes asociadas al cáncer de piel según estadísticas del INCAN. Esta enfermedad ha tenido un incremento de 500% en los últimos años en nuestro país, se prevé que esta tasa seguirá creciendo en el futuro^{2,4}. La OMS reporta que en el año 2000 la tasa de mortalidad era de 0.4 y para 2020 aumentó hasta 0.86 lo cual representa un aumento del 115% en mortalidad ⁵⁻⁷, además de que la sobrevida reportada para México es menos del 60% incluso desde etapas tempranas ⁸, lo que señala la importancia de estudiar al melanoma en población mexicana.

CLASIFICACIÓN Y TIPOS DE MELANOMA

Una de las formas más aceptadas para clasificar el melanoma es de acuerdo con el sitio anatómico donde se origina la lesión primaria, encontrando cuatro tipos de melanoma diferentes; melanoma uveal, mucosal, cutáneo o acral.

La forma cutánea es la de mayor incidencia en países con población caucásica y se origina en cualquier sitio de la piel excluyendo los sitios acrales. El melanoma cutáneo suele aparecer en zonas expuestas a luz solar como extremidades superiores y cara^{3,9}.

El melanoma acral es aquel que se origina en palmas, uñas y plantas de los pies zonas poco expuestas a la luz solar y que están protegidas por una capa gruesa de estrato córneo¹⁰. Esta forma de melanoma representa entre 1%-8 % en países europeos y entre 2%-3% en Estados Unidos ^{11,12} considerándose una forma poco frecuente de melanoma. A pesar de ello en Asia, África y Latinoamérica representa más del 50% de los casos. Específicamente en México la incidencia reportada es

del 54%¹⁰ . Al originarse en sitios con menos exposición a luz solar se piensa que el melanoma acral tiene una etiología diferente a la exposición a luz UV.

La mayoría de los melanomas cutáneos son mutantes de BRAF, NRAS o NF1, una firma de exposición a luz UV, sin embargo, la mayoría de los melanomas acrales son tipo silvestre para estos genes¹³. Adicionalmente, estudios de secuenciación de genoma encontraron que el melanoma cutáneo se caracteriza por presentar mutaciones de un solo nucleótido así como inserciones y deleciones , comparado a melanomas acrales y mucosales donde predominan cambios genéticos estructurales como rearrreglos cromosómicos, inversiones, etc , demostrando que a nivel genético estos dos tipos de melanoma son diferentes¹⁴.

Algunos autores han encontrado asociación con traumas mecánicos e incidencia del melanoma acral, sin embargo, algunos hallazgos recientes mencionan que no existe relación entre el estrés mecánico y la incidencia del melanoma en la planta de los pies^{15,16}. Por ello se sugiere que el origen del melanoma acral es multifactorial entrando en juego factores genéticos y ambientales que aún no son del todo conocidos. Todo lo anterior resalta la importancia del estudio de la fisiopatología del melanoma en población mexicana buscando profundizar en los factores involucrados en un buen o mal pronóstico de la enfermedad^{11,17}.

ESTADIFICACIÓN Y TRATAMIENTO DEL MELANOMA

El estándar de oro para diagnosticar el melanoma sigue siendo la histopatología junto con características clínicas que presentan los pacientes. Como ya se mencionó, el melanoma deriva de los melanocitos, los cuales se encuentran en la capa basal de la epidermis desde donde cursaran en dos etapas de progresión; la primera, donde el melanocito formara parches o placas que se extienden de forma horizontal radial y una segunda fase que será de crecimiento vertical, donde el melanocito infiltrara hacia dermis o crecerá elevando la epidermis formando nódulos ¹⁸. Se ha descrito que los melanomas en que sólo se encuentran en fase de progresión radial son de mejor pronóstico comparado a la fase vertical que tiene mayor potencial de metástasis. Para detectar una lesión sospechosa suele utilizarse

la mnemotecnia "ABCDE" donde A=asimetría, B= bordes irregulares, C=color variado, D=diámetro >4mm, E=elevación y/o evolución. Dichos criterios, aunque no son una regla, pueden brindar indicios de si un lunar o área pigmentada podrían ser sospechosas de melanoma¹⁹.

De acuerdo con la Sociedad Americana de Cáncer el melanoma puede clasificarse en cinco etapas que abarcan de la 0 a la IV, donde las primeras tres no tienen signos de metástasis, la etapa III muestra diseminación a ganglios linfáticos y/o tejidos cercanos, y la etapa IV caracterizada por invasión a regiones distantes u órganos como pulmón o cerebro²⁰. Además de la estadificación también se suele obtener el TNM (Tumor Nodule Metastasis), índice de Breslow, tasa mitótica, etc. los cuales se utilizan en la clínica para poder discriminar que tan avanzando o agresivo puede ser el melanoma ya que hacen referencia a qué tan rápido se ha diseminado el melanoma.

El tratamiento en etapas tempranas será completamente quirúrgico y en algunos casos se sugiere conjuntar con el uso de radioterapia, obteniendo buenos porcentajes de respuesta e incluso la remisión de los pacientes²¹. Es necesario mencionar que en México la mayoría de los pacientes son diagnosticados en fase III (fase I-26.1%, fase II-30.6%, fase III-38.8%, fase IV-4.5%)²², donde la cirugía no será suficiente. Específicamente en México se suele utilizar quimioterapéuticos a partir de etapa III, mostrando una respuesta menor al 20%, destacando la importancia de implementar nuevas estrategias terapéuticas²³. Esto ha llevado a la implementación de otras alternativas como lo es el uso de inmunoterapia de punto de control, tales como anticuerpos anti-PD-1 y/o anti-CTLA-4, cuya función será incrementar la respuesta celular de linfocitos T frente al tumor. Este tipo de terapias buscan activar la respuesta inmune inhibiendo estos "frenos" inmunológicos para así lograr el control tumoral. De tal modo, la inmunoterapia ha sido ampliamente utilizada, presentando mejoras en la sobrevivencia de los pacientes, sin embargo, no todos responden o varios recaen en la enfermedad²⁴, recalcando la necesidad de estudiar a profundidad la respuesta inmunológica frente al cáncer, poniendo

especial énfasis en las poblaciones presentes en el infiltrado tumoral que puedan representar un factor pronóstico, tanto como para el control de la enfermedad como para la elección de un tratamiento adecuado.

RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN MELANOMA

Estudios de secuenciación de alto rendimiento han revelado que el melanoma presenta más de 10 mutaciones por megabase de DNA, siendo algunos de los genes más afectados *BRAF*, *NRAS*, *NF1*, *CDKN2A*, *MCR1*, etc. Ello coloca al melanoma como el tumor con más carga mutacional de todos los tumores humanos y en neoplasia altamente inmunogénica^{9,25}. Sin embargo, esta información es predominantemente de melanoma cutáneo. De tal modo, el melanoma resulta un modelo ideal para estudiar la respuesta inmunológica y las células involucradas en el microambiente tumoral (TME) y su papel en el control de este.

Para tener una respuesta inmunológica que logre proteger frente al cáncer será necesario generar células capaces de destruir y controlar al tumor, evitando que este escape por fenómenos de inmunoeedición²⁶. Diversos estudios han demostrado que el infiltrado celular de linfocitos T en un tumor se relaciona con un mejor pronóstico para el paciente, ya que dentro de los componentes más importantes del sistema inmunológico se encuentra la respuesta mediada por IFN- γ y por los linfocitos T CD8+ y Th cooperadores CD4+²⁷.

LINFOCITOS T, MEMORIA Y AGOTAMIENTO

Una de las poblaciones inmunológicas más importantes en el control tumoral son los linfocitos T residentes de tejidos (Trm) ya que han evidenciado ser relevantes en el control de tumores sólidos²⁸. Se ha demostrado que su inducción a través del uso de vacunas y adyuvantes puede proteger frente al desarrollo de esta enfermedad²⁹⁻³¹. Los linfocitos Trm surgen tras una respuesta primaria frente a un estímulo, por ejemplo, una infección viral, o en caso del cáncer una célula tumoral³², lo cual provocará que en ganglio linfático se activen linfocitos T que viajarán a

periferia a ejercer su función³³. Posteriormente tomarán residencia permanente en el tejido como células de memoria capaces de responder de manera rápida frente a un estímulo ^{34,35}, brindando protección frente al patógeno o célula transformada. Se sabe que la mayoría de estos Trm deriva del mismo precursor (CD127+KLRG1-) que da origen a otras poblaciones de memoria ³⁶; una vez que éste llega al tejido recibe señales que inducen la expresión de CD69, una lectina tipo-C y la integrina CD103, la cual se une a E-cadherina en células epiteliales, confiriéndole la capacidad de permanecer anclado al tejido y no responder a las señales de migración ²⁹. Una vez establecidos podrán responder rápidamente frente a estímulos, reclutar y activar a más poblaciones inmunológicas mediante la producción de IFN- γ ³⁵.

El agotamiento en Linfocitos T es resultado de la exposición crónica a antígenos, como ocurre en el contexto del cáncer o infecciones virales crónicas. Las características del agotamiento incluyen la pérdida progresiva de proliferación y de respuesta. Originalmente se describieron en ratón dos poblaciones de linfocitos T con fenotipo de agotamiento; una que expresa PD-1, TIM-3 y carece de funcionalidad ya que no prolifera ni produce IFN- γ , y otra con fenotipo precursor, la cual expresa TCF-1, PD-1, no expresa TIM-3 y además es capaz de proliferar y de expresar IFN- γ ³⁷. Adicionalmente mediante secuenciación de RNA de una célula se encontró recientemente que el agotamiento es mucho más complejo, demostrando evidencia de al menos cuatro poblaciones agotadas; dos progenitoras que expresan TCF7, una quiescente que expresa CD69, otra proliferativa que deja de expresar CD69, además una intermedia que todavía conserva características de proliferación y función, pero ya no expresa TCF7 y una terminalmente agotada que (ref). Se ha descrito que estas poblaciones también existen en el humano y que específicamente aquellas con un fenotipo progenitor pueden estar relacionadas con un mejor pronóstico y respuesta a la inmunoterapia de punto de control^{38,39}, cabe mencionar que en estos estudios dejan claro que estas poblaciones son heterogéneas, dejando claro que es necesaria una caracterización más profunda de las mismas y su rol en el control de la enfermedad.

CELULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas (DCs), por su capacidad de responder a diversas señales, junto con la existencia de subpoblaciones con funciones únicas, posicionan a estas células como clave en la iniciación y regulación de la respuesta inmune ⁴⁰. Éstas al reconocer un antígeno tumoral y procesarlo, coordinarán la activación de linfocitos TCD4+ mediante la presentación en MHCII, o de linfocitos TDC8+ por presentación cruzada en MHCI, involucrándose en ambos casos moléculas de coestimulación, tales como CD80/CD86, CD40 o inhibitorias como PD-L1⁴⁰. Recientemente se ha descrito que la presencia de estas células en algunos tipos de cáncer correlaciona con la existencia de nichos de linfocitos TCD8 con fenotipo precursor en el TME (microambiente tumoral) y estos a su vez con una mayor tasa de supervivencia para el paciente ⁴¹.

Las células dendríticas clásicas tipo 1 (cDC1), distinguidas por la expresión de CD11c, HLA-DR, BDCA-3 y el factor transcripcional IRF8 han demostrado ser la subpoblación de DCs más eficiente activando la respuesta de linfocitos T CD8 ⁴². mayor capacidad de realizar presentación cruzada, debido a que son menos proteolíticas que otras APC u otros subtipos de DCs. Esto las hace eficientes llevando antígenos a los ganglios linfáticos y activando la respuesta inmune^{43,44}. Se ha demostrado que son una de las poblaciones requeridas para inducir a los linfocitos Trm ⁴⁵ y que son necesarias en diversos tipos de cáncer, sin contar con información completa de su papel en melanoma cutáneo. Algunos estudios en modelos murinos sugieren que existe relación entre la presencia de las cDC1 y una mejor respuesta del melanoma a terapias bloqueadoras de puntos de control ^{46,47}. Adicionalmente se ha observado que la abundancia de cDC1 en sangre de pacientes con melanoma disminuye conforme la etapa avanza, sin llegar a esclarecer su papel, por lo que se vuelve importante estudiar el fenotipo de estas y si se encuentran presentes en el microambiente tumoral ⁴⁸.

Considerando estos antecedentes y tomando en cuenta que el melanoma es un cáncer en donde las características de la respuesta inmune indican ser cruciales, el

estudio de las poblaciones inmunológicas que infiltran el tumor sugiere ser de gran relevancia, para que en conjunto con otras variables clínicas se pueda establecer una relación que permita plantear marcadores que sirvan como indicadores de buen o mal pronóstico.

INTELIGENCIA ARTIFICIAL PARA EL ANÁLISIS DE POBLACIONES INMUNES

Un examen exhaustivo del microambiente tumoral requiere enfoques multiparamétricos para evaluar la presencia de células inmunitarias específicas, así como marcadores de rendimiento, en particular los asociados al control del tumor. La inmunofluorescencia multiplexada (mIF) implica el análisis de varios marcadores dentro de una sola muestra, proporcionando imágenes ricas en información que informan de la presencia de diferentes células inmunitarias que coexisten en la EMT, su relación espacial entre sí y con las células tumorales, proporcionando en última instancia una instantánea de la arquitectura biológica del tejido⁴⁹. El análisis manual de un conjunto de imágenes mIF, en el que cada imagen puede contener de cientos a miles de células con múltiples marcadores, es un proceso que requiere mucho tiempo y es propenso a errores, con el riesgo de introducir un sesgo subjetivo en su selección⁵⁰.

La inteligencia artificial (IA) es un campo de la ciencia de los datos centrado en la programación de una máquina para que realice múltiples tareas como un humano. El aprendizaje automático (ML) es una aplicación de la IA en la que los algoritmos leen, analizan y aprenden de los conjuntos de datos de entrada para posteriormente tomar decisiones informadas. El aprendizaje profundo (DL) es un subconjunto de técnicas de ML por el que los algoritmos se estructuran en capas que forman una red neuronal artificial, lo que permite a los ordenadores representar eficazmente los datos con múltiples niveles de abstracción para extraer progresivamente características de nivel superior⁵¹. La DL ha demostrado ser especialmente potente en el análisis de imágenes clínicas en los últimos años, por ejemplo, en el diagnóstico de enfermedades⁵². El uso de la DL tiene varias ventajas sobre los diagnósticos manuales basados en imágenes, por ejemplo, una mayor precisión^{53,54}, un rendimiento muy mejorado, la ausencia de sesgos subjetivos y una

mayor reproducibilidad ⁵⁰. Es por ello que poder analizar a las poblaciones inmunes presentes en el infiltrado de pacientes con melanoma utilizando herramientas de inteligencia artificial puede brindar información nueva y relevante que ayuda a entender los factores asociados al control de la enfermedad.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la presencia, fenotipo y distribución de poblaciones de linfocitos T y células dendríticas presentes en el infiltrado tumoral de pacientes con melanoma, así como determinar su correlación con el control de la enfermedad.

V. OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar el fenotipo de linfocitos T CD8 presentes en el infiltrado tumoral de pacientes con melanoma acral y cutáneo, así como la relación de éste con el control de la enfermedad.
- Determinar la presencia de cDC1 en el infiltrado tumoral de pacientes con melanoma acral y cutáneo, así como la relación de esta población con el control de la enfermedad.
- Determinar el fenotipo activador o inhibidor de células dendríticas clásicas tipo 1 y así como la relación de estas células con linfocitos T CD8 en el infiltrado tumoral de productos de resección de pacientes con melanoma cutáneo
- Correlacionar las células presentes en el infiltrado tumoral y en el ganglio linfático centinela con las características clínicas del paciente.
- Determinar la distribución, localización, así como posibles interacciones de los linfocitos T CD8 con fenotipos específicos y cDC1 en el sitio tumoral

VI. HIPOTESIS

La presencia, fenotipo y distribución de los linfocitos T y células dendríticas en el infiltrado tumoral de pacientes con melanoma podrá correlacionarse con el control de la enfermedad.

VII. METODOLOGÍA

Tinciones de Inmunofluorescencia

Para las tinciones de inmunofluorescencia se utilizaron productos de resección quirúrgica de melanoma cutáneo pertenecientes al archivo del departamento de patología del Hospital de Oncología de Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Se realizaron cortes de bloques de parafina de los productos de resección. Las laminillas fueron incubadas una hora a 70 °C para eliminar la parafina, posteriormente se sometieron a un tren de solventes de Xilol y EtOH para rehidratar el tejido. Para llevar a cabo la recuperación antigénica se incubaron 20 min a 90 °C en buffer de citratos pH=6.0 (citrato de sodio 10 µM). Los tejidos fueron tratados con solución permeabilizante durante tres horas. Posteriormente se evaluó la población de linfocitos T CD8+ mediante los siguientes paneles de tinción con anticuerpos primarios anti CD8, CD103 y TCF-1; CD8, CD103 e IFN-γ, CD8 CD103 y PD-1. La población de células dendríticas se evaluó con los marcadores HLA-DR, CD11c y BDCA3 para distinguir a la población clásica tipo uno, se conservaron los últimos dos marcadores para distinguir a la población y se añadió PD-L1 o CD40 a la tinción. Todas las marcas fueron reveladas utilizando AF488, AF594 y AF647.

Tinción de inmunofluorescencia multiplex o t-CyCIF (tissue-based cyclic immunofluorescence)

Para esta técnica se realizaron las inmunofluorescencias de la manera ya descrita con anticuerpos primarios y secundarios, anti CD8 (AF594) anti TCF7(AF488) anti CD103 (AF647) anti CD11c(AF488) posteriormente se procedió a apagar los fluorocromos incubando el tejido en una solución oxidante H₂O₂ al 4.5% y NaOH 24mM con exposición a luz blanca 60 minutos. Posteriormente, tras verificación del apagado en microscopio confocal se procedió a teñir con anticuerpos acoplados a fluorocromos anti-CD45RO(APC) anti-PD-1(PE), anti-CD40(FITC) y anti-PDL1 (APC) y retinción de los núcleos con Hoechst. Al evaluar el tejido por microscopía confocal se buscaron captar los mismos campos captados en el primer ciclo de

tinción por lo cual mediante análisis de imágenes en imageJ fue posible alinear los núcleos y empalmar las marcas en una sola imagen.

Obtención de imágenes

Las laminillas de Hematoxilina & Eosina se evaluaron mediante Aperio CS2 Slide Scanner (Leica systems) y analizadas mediante el software Aperio ImageScope 12.4.3, Leica Biosystems. Las laminillas de inmunofluorescencia se evaluaron mediante microscopio confocal (Microscopio confocal Nikon A1+) y las imágenes fueron analizadas mediante el software ImageJ 1.52p, NIH, USA. Se eligieron áreas altamente infiltradas cercanas al área tumoral, se contaron cien células y de estas se contabilizó aquellas que expresaran las marcas de interés según fuera el panel de tinción, esto se realizó en tres campos diferentes para obtener el porcentaje promedio de cada paciente.

Análisis mediante Machine Learning para Cuantificación.

Para la cuantificación de las diferentes poblaciones, así como evaluación de densidad celular y expresión de marcadores se empleó una metodología de análisis de imágenes basada en machine learning considerando tres campos cercanos al tumor, altamente infiltrados por cada paciente. Para ello los núcleos de cada imagen fueron segmentados utilizando la red neuronal convolucional entrenada Cellpose en la plataforma Google colab. Una vez que se obtuvieron los núcleos segmentados se entrenaron clasificadores específicos para detectar células positivas y negativas por cada cada marcador utilizando la herramienta de ImageJ, Annotater. Una vez que se entrenaron estos clasificadores se realizó el análisis del conjunto total de imágenes. Los clasificadores utilizan a los núcleos segmentados para evaluar célula por célula la expresión de cada marcador, permitiendo evaluar el porcentaje de cada población, así como fenotipos específicos (**Figura 1A**).

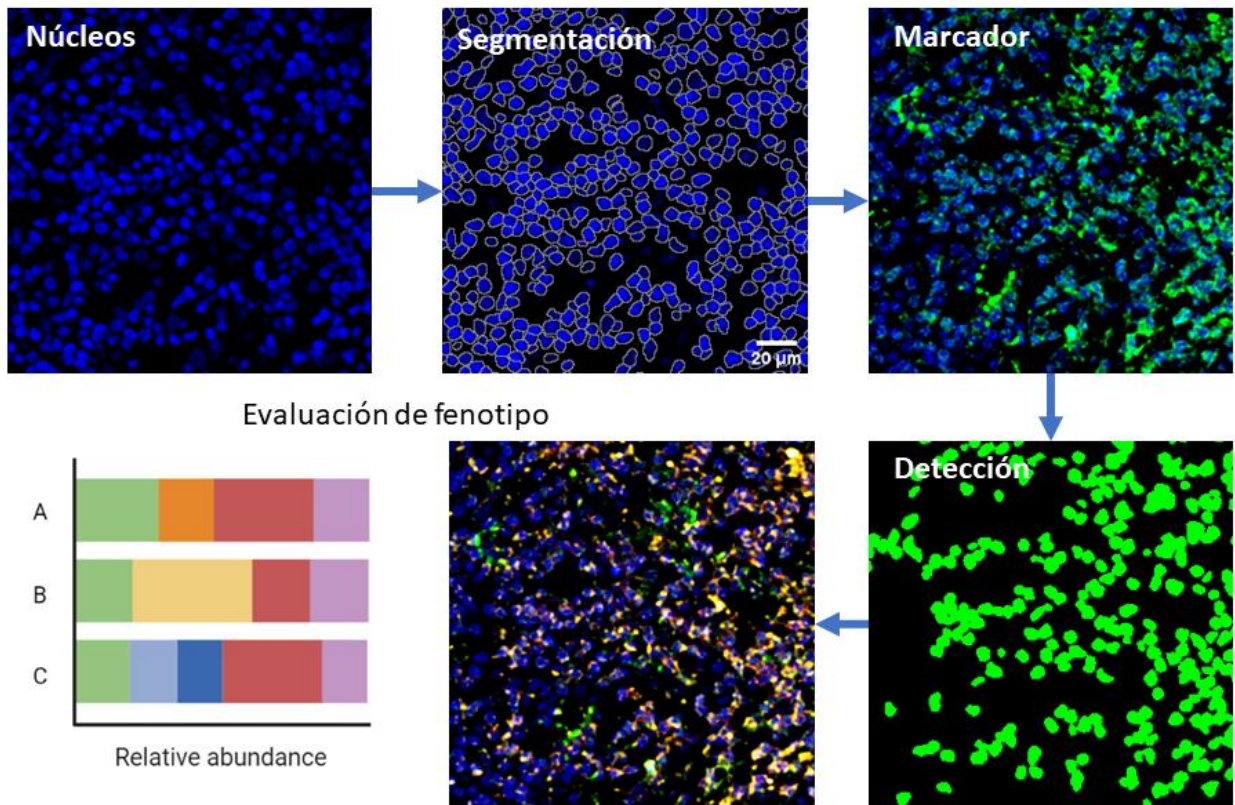


Figura 1. Metodología de análisis basada en Machine-Learning.

A Estrategia de análisis. Cada imagen fue segmentada basada en el canal de núcleos para definir número y coordenadas. Posteriormente utilizando clasificadores entrenados se realizó la detección de células positivas y negativas para cada marcador. Finalmente se realizó la interpretación de datos para evaluar el fenotipo y la abundancia celular.

Análisis estadístico

Para las pruebas estadísticas se utilizó el software GraphPad Prism V8, USA, utilizando prueba de Mann-Whitney para datos no paramétricos y la prueba de Kruskal Wallis para comparación multiparamétrica en los casos donde había tres grupos de datos.

VIII. RESULTADOS

Características clínicas de la cohorte de estudio.

Para evaluar a las poblaciones inmunes presentes en el infiltrado de pacientes con melanoma, así como observar diferencias entre melanoma acral y cutáneo, se obtuvieron productos de resección embebidos en parafina. Dichos productos reflejan el estado del paciente al momento de ser diagnosticado con melanoma, conociéndose también en este punto indicadores clínicos como TNM, índice de Breslow, etc. Adicionalmente se tiene la evolución clínica de estos pacientes tras una consulta de seguimiento dos años promedio después de recibir su diagnóstico (**Figura 2A**). Esta información fue utilizada para clasificar a los pacientes en tres grupos de estudio; metastásicos iniciales (MI) aquellos que desde el diagnóstico mostraron evidencia invasión de melanoma a otros órganos; Evolución a metástasis (EM) aquellos que no tenían diseminación en el diagnóstico, pero sí en la consulta de seguimiento y Libres de enfermedad (LE) a aquellos que en su consulta de seguimiento fueron remitidos de la enfermedad. Siendo así, se contó con un total de 36 sujetos de estudio donde 9 fueron MI (25%), 2 EM (5.5%) 22 pacientes LE (61%) (**Figura 2B**) (**Tabla 1**). Además, se observó que la mayoría de los pacientes representan casos de melanoma acral (78%) comparado a melanoma cutáneo (12%) y que la mayoría de los pacientes se diagnosticaron en fase I y II (**Figura 2C, D**).

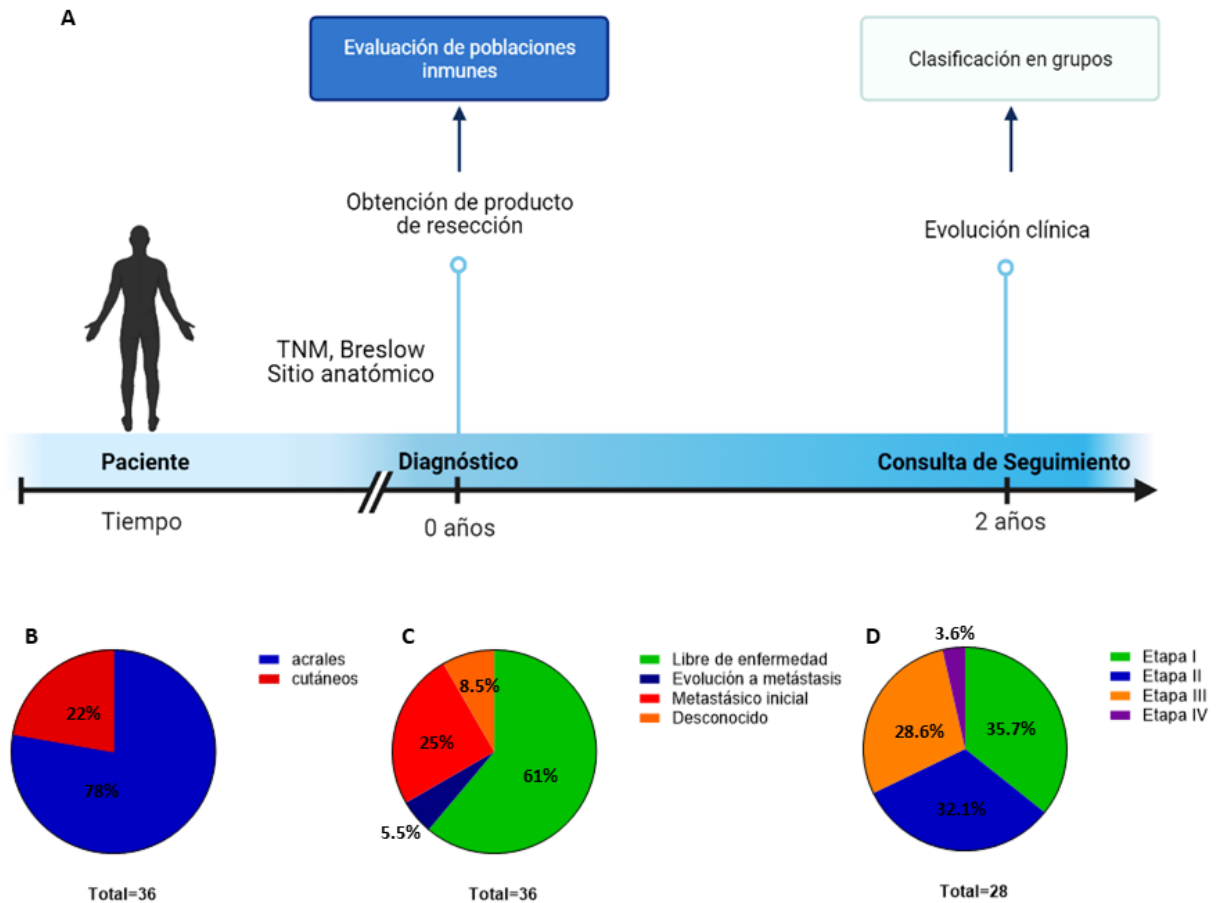


Figura 2. Características de la población de estudio.

A. Línea que representa puntos del tiempo donde se obtuvo información clínica para clasificación de pacientes. Todos los productos de resección evaluados reflejan la condición del paciente al momento de ser diagnosticado con melanoma. **B.** Distribución en porcentaje de pacientes de acuerdo con el tipo de melanoma. **C.** Distribución en porcentaje de la población de estudio de acuerdo con su estado en el diagnóstico y su evolución clínica. Pacientes con metástasis en el diagnóstico fueron clasificados como metastásicos iniciales. Pacientes sin metástasis en diagnóstico, pero si en el seguimiento fueron clasificados como evolución a metástasis. Pacientes con diagnóstico de melanoma que en el seguimiento resultaron remitidos fueron clasificados como pacientes libres de enfermedad. **D.** Distribución en porcentaje de acuerdo con la etapa en que los pacientes fueron diagnosticados.

Tabla 1. Características clínicas de la cohorte de pacientes. La evolución clínica se clasificó de acuerdo con un seguimiento después de dos años a partir del diagnóstico. NR=No reportado.

No. Pacientes	Clasificación	T	N	M	Breslow (mm)	Tipo de melanoma	Evolución clínica	Tiempo de evolución	
1	5406	LE	2	0	0	2	Cutáneo	Libre de enfermedad	3 años
2	2126	LE	1	0	0	0.8	Cutáneo	Libre de enfermedad	2años
3	2242	LE	T1A	0	0	0.3	Cutáneo	Libre de enfermedad	1 año
4	5835	LE	T3	0	0	3	Cutáneo	Libre de enfermedad	2 años
5	9577	LE	T1A	0	0	0.25	Cutáneo	Libre de enfermedad	3 años
6	0980	LE	T1A	0	0	0.1	Cutáneo	Libre de enfermedad	2 años
7	3966	LE	T1S	0	0	NR	Acral	Libre de enfermedad	2 años
8	7566	LE	T1S	0	0	NR	Acral	Libre de enfermedad	2 años
9	0470	LE	T4B	0	0	23	Acral	Libre de enfermedad	2 años
10	9870	LE	T2	0	0	13	Acral	Libre de enfermedad	2 años
11	9271	LE	T3B	0	0	3	Acral	Libre de enfermedad	2 años
12	8974	LE	T4B	NX	0	13	Acral	Libre de enfermedad	2 años
13	3281	LE	T4B	0	0	6	Acral	Libre de enfermedad	2 años
14	2485	LE	T1A	0	0	0.4	Acral	Libre de enfermedad	2 años
15	3285	LE	T2B	0	0	2	Acral	Libre de enfermedad	2 años
16	1009	LE	2	0	0	1.1	Acral	Libre de enfermedad	2 años
17	8011	LE	4	1	0	4	Acral	Libre de enfermedad	3 años
18	5017	LE	1	0	0	0.6	Acral	Libre de enfermedad	2 años
19	6321	LE	T1S	0	0	NR	Acral	Libre de enfermedad	2 años
20	2030	LE	T2	0	0	2	Acral	Libre de enfermedad	1 año
21	9242	LE	T4B	0	0	12	Acral	Libre de enfermedad	1.5 años
22	4953	LE	T3B	0	0	2.2	Acral	Libre de enfermedad	2 años
23	1628	EM	T4B	0	0	12	Acral	Metástasis a hígado y pulmón	NR
24	1134	EM	T4B	0	0	11	Acral	Progresión loco-regional	2 AÑOS
25	5532	MI	T4B	1B	0	7	Acral	Metástasis loco-regional, progresión a pulmón, hígado, mediastino e invasión abdominopélvica	2años
26	2847	MI	T4B	NR	IB	12	Acral	Metástasis a SNC, pulmón e hígado	2 años
27	4563	MI	T4B	3C	0	13	Acral	Metástasis ganglionares	7 meses
28	7737	MI	T4B	1	0	11	Acral	Metástasis a pulmón e hígado	1 año
29	5539	MI	T4B	3C	0	4	Acral	Actividad inguinal con múltiples lesiones satélites	1 año
30	9367	MI	NR	NR	NR	15	Acral	Invasión a ganglios linfáticos	2 años
31	6772	MI	T4B	1B	0	4	Acral	Actividad inguinal con múltiples lesiones satélites	1 año
32	4273	MI	T4B	3	0	15	Acral	Invasión a ganglios linfáticos	2 años
33	9337	MI	T4B	1	0	23	Cutáneo	Progresión loco-regional	2 años
34	0879	NR	3	0	0	3	Acral	Metástasis inguinal	2años
35	0765	NR	T2	1	0	13	Acral	NR	NR
36	3091	NR	T4B	0	0		Acral	Libre de enfermedad	2 años

Análisis de la histología de pacientes con melanoma acral y cutáneo.

Una de las primeras preguntas a responder es qué tan diferente es el infiltrado de pacientes con melanoma cutáneo vs melanoma acral. Buscando distinguir las características histológicas del tejido y conocer la localización del infiltrado inmunológico, se realizaron tinciones con Hematoxilina y Eosina (HE) evaluadas por microscopía de campo claro. Este análisis permitió evaluar las características estructurales, las zonas de transformación y la localización del infiltrado inmune de los diferentes tejidos. Se logró observar las diferencias histológicas entre melanoma cutáneo y acral de dos pacientes LE; para el primer caso la epidermis mostro ser delgada además de haber varios folículos pilosos y glándulas sudoríparas, por otro lado, para el melanoma acral la piel mostró tener un estrato córneo y epidermis gruesa, así como ausencia de folículos pilosos, destacando que estos dos tipos de melanoma son diferentes también a nivel histológico a pesar de derivarse de la misma célula (**Figura 3**). Adicionalmente se compararon melanomas acrales y cutáneos con TNM e índices de Breslow similares observando, por ejemplo, que los melanomas del tipo *in situ* muestran un crecimiento tumoral recluido a la epidermis y las zonas de infiltrado se encuentran en la frontera dermis-epidermis, cercanas a la transformación (**Figura 4A**). Por otro lado, los melanomas del tipo nodular muestran una invasión vertical con respecto a la epidermis, llegando a dermis y en algunos casos a capa subcutánea; las zonas de infiltrado se encontraron a la periferia del tumor (**Figura 4B**). Esté análisis además de permitir mapear las zonas de infiltrado, además se demostró que pacientes con características histológicas y clínicas similares tuvieron una evolución diferente, destacando la importancia de un análisis más profundo de los factores que pueden ser de buen o mal pronóstico. Este acercamiento histológico estableció las bases para los posteriores análisis.

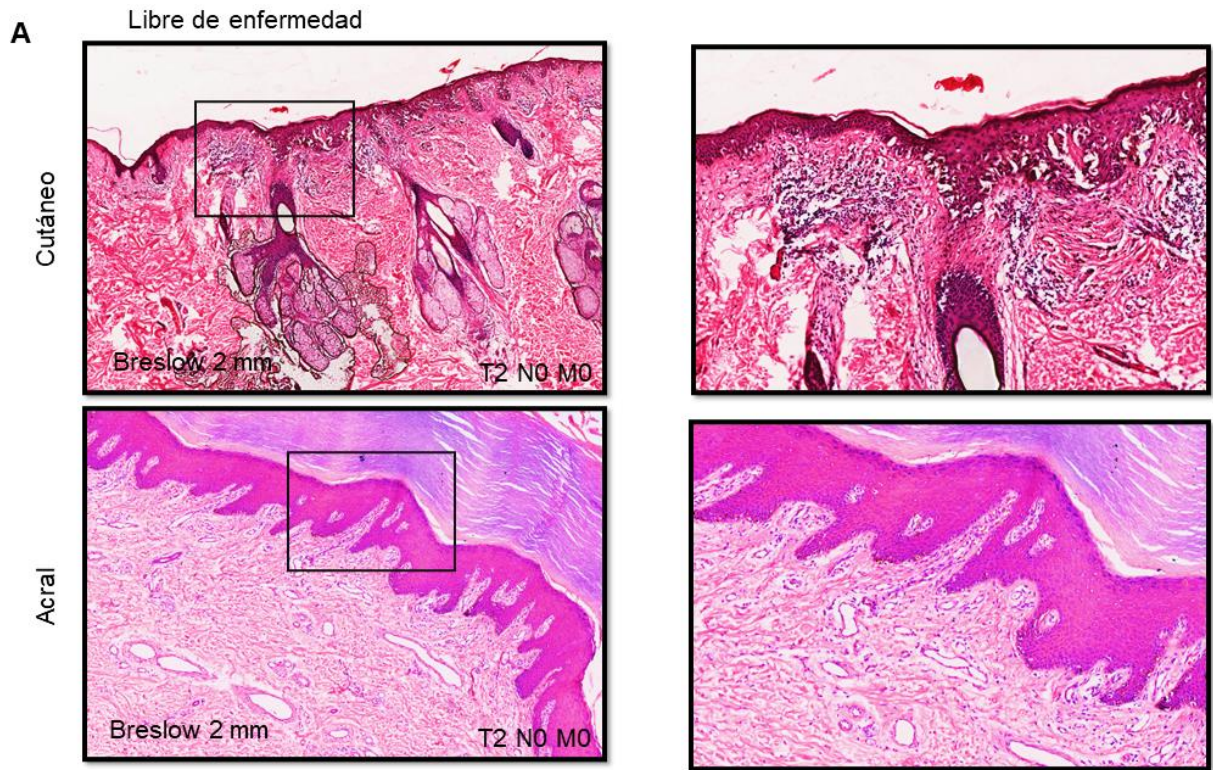


Figura 3. Diferencias histológicas entre melanoma cutáneo y acral

A. Tinción de Hematoxilina & Eosina (HE) para un paciente con melanoma cutáneo y un paciente con melanoma acral. Los melanomas originarios de sitios cutáneos muestran una epidermis delgada, así como la presencia de folículos pilosos y glándulas sudoríparas. Los melanomas originarios sitios acrales muestran una epidermis gruesa y ausencia de folículos y glándulas. Epidermis orientada hacia arriba. Acercamiento del área seleccionada en negro.

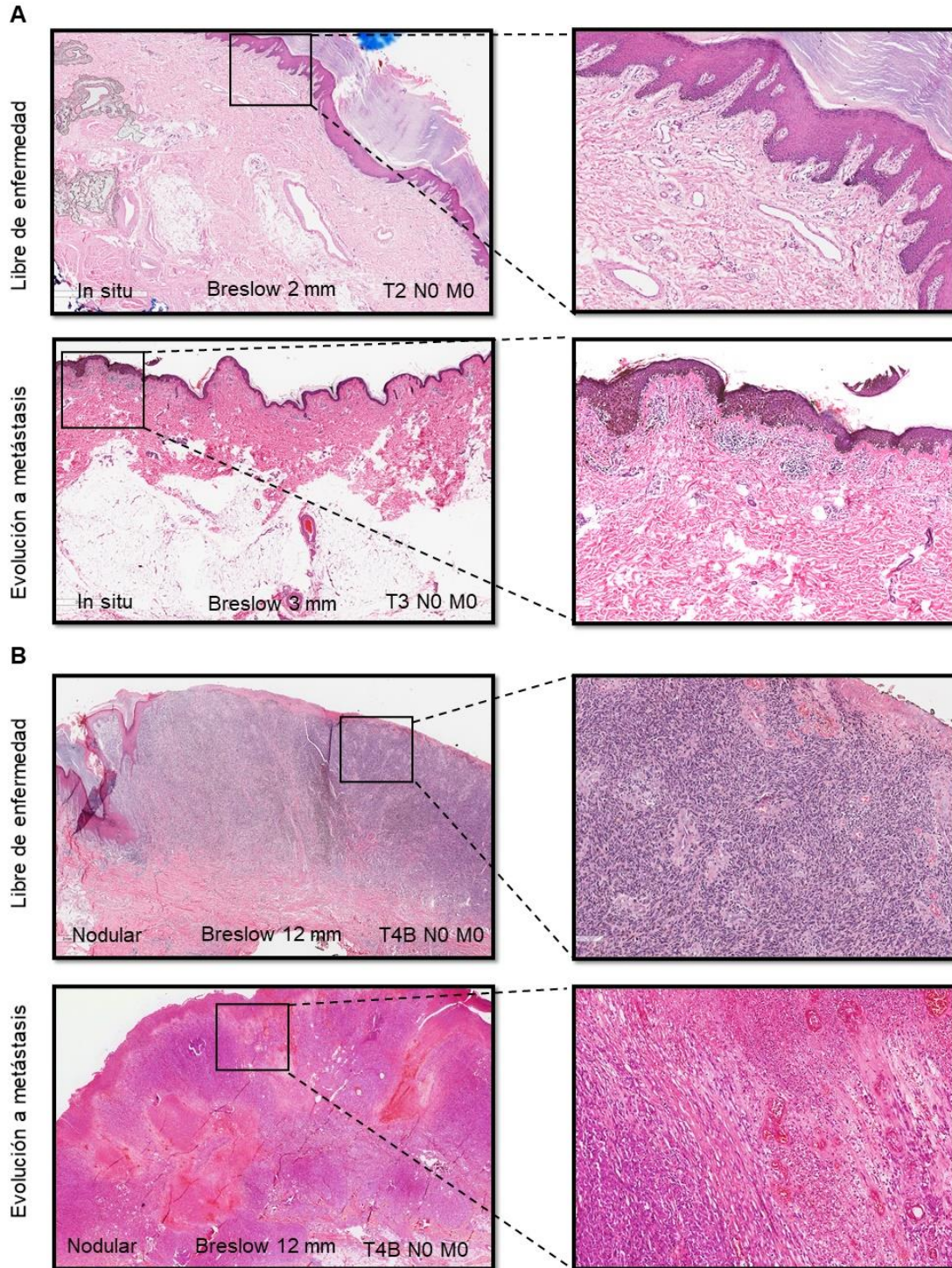


Figura 4. Histología cutánea de pacientes con melanoma.

Micrografías representativas de tinciones de Hematoxilina & Eosina (HE) en cortes de productos de resección de melanoma cutánea para **A** pacientes con melanoma *in situ* de crecimiento recluido a la epidermis y un TNM y Breslow similar, cuya evolución a largo plazo fue diferente **B** pacientes con melanoma nodular que muestran invasión a dermis y capa subcutánea, así con un TNM y Breslow similar, pero la evolución a largo plazo fue diferente. Epidermis orientada hacia arriba. Acercamiento del área seleccionada en negro.

Evaluación de linfocitos T presentes en el infiltrado tumoral de melanoma.

Una vez establecidas las características histológicas y las zonas de infiltrado tumoral nos preguntamos si la composición del infiltrado inmune podría ser diferente entre los diferentes tipos de melanoma, así como los grupos de estudio. Para ello utilizando análisis de imágenes basado en inteligencia artificial se buscó responder si el infiltrado de linfocitos CD8 totales podría ser diferente entre melanoma acral y cutáneo, encontrando que no hay diferencias significativas entre los dos tipos de melanoma ni en abundancia ni en densidad (**Figura 5A,5B, 5C**). Al observar que melanoma acral y cutáneo no son diferentes a nivel de abundancia de linfocitos CD8 se decidió unir ambos grupos de estudio y se dividieron de acuerdo con la evolución clínica de los pacientes. Este análisis permitió observar que los CD8 que estas no representan una diferencia entre los pacientes libres de enfermedad (LE) metastásicos iniciales (MI) y de evolución a metástasis (EM) (**Figura 5D**), mostrando que la abundancia de esta población sólo es diferente de acuerdo con el estadio del melanoma (**Figura 5E**). Estos resultados destacan la importancia de estudiar con mayor detalle el fenotipo de los linfocitos CD8 buscando específicamente que poblaciones pueden representar una diferencia entre los pacientes que controlan la enfermedad de los que no además de que permiten evidenciar que a nivel de infiltrado de linfocitos CD8 no hay diferencia entre melanoma acral y cutáneo.

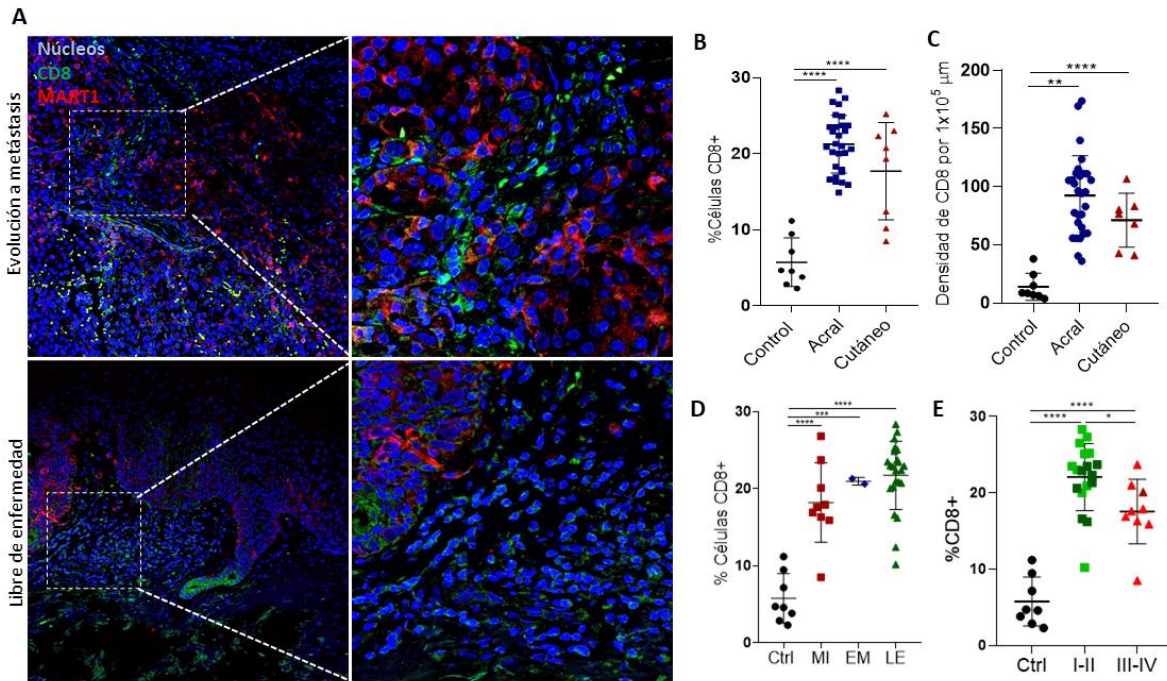


Figura 5. Linfocitos CD8 en el infiltrado de pacientes con melanoma no se relacionan al control de la enfermedad.

Tinciones de inmunofluorescencia para **A** CD8 (verde) MART-1(rojo) y núcleos (azul). Micrografías representativas de zonas altamente infiltradas de pacientes que evolucionaron a metástasis o permanecieron libres de la enfermedad tras dos años de seguimiento. Acercamiento del área seleccionada en blanco. Imágenes observadas a 20x y zoom digital 3x. (Barra de escala 20 μm). **B** Porcentaje de linfocitos CD8+ presentes en infiltrado inmune **C** Densidad linfocitos CD8+ por cada 1×10^5 micrómetros cuadrados **B-C** cuantificaciones en piel control (n=7) melanoma acral (n=28) y melanoma cutáneo (n=8) **D** Porcentaje de linfocitos CD8 en piel control (negro, n=7) metastásico inicial (rojo, n=9), evolución a metástasis (azul, n=2) libres de enfermedad(verde, n=22) de melanoma acral y cutáneo combinado **E**. Porcentaje de linfocitos CD8+ de acuerdo con estadiaje. Estadio-I verde claro, n=10. Estadio-II verde oscuro, n=9. Estadio-III rojo, n=8. Estadio-IV vino, n=1. Prueba ANOVA de una vía con comparación multiparamétrica * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$

Evaluación de diferentes fenotipos de linfocitos CD8 y su relación con el control de la enfermedad

Una vez que se observó que los linfocitos CD8 como población total no parecen estar relacionados con el control de la enfermedad se buscó profundizar específicamente en el fenotipo de esta población en la cohorte de estudio completa sin distinguir el tipo de melanoma (**Figura 6A**). Considerando antecedentes directos del laboratorio, donde se encontró en modelos murinos que una población CD8 que expresa CD103 y TCF7 puede ser importante en la respuesta antitumoral generada con el uso de adyuvantes, se buscó evaluar a esta población en el infiltrado de los sujetos de estudio³⁰. Se encontró específicamente que linfocitos CD8+ TCF7+ están incrementados en pacientes LE, sin embargo, al evaluar a la población TCF7 que no expresa CD103 no se observan diferencias entre los grupos de estudio y la población CD8+ CD103+ que no expresa TCF7 parece incluso ser más abundante en los pacientes MI y EM a nivel de infiltrado total (**Figura 6B**). Este resultado indica que los linfocitos CD8 con fenotipo CD103+ TCF7+ son los que podrían estar relacionados al control de la enfermedad. Adicionalmente se evaluó la composición fenotípica de la fracción CD8, encontrando que en los LE hay un predominio de la población CD8+ CD103+ TCF7+ (**Figura 6C**). Una vez que se estableció la importancia del fenotipo CD8, se encontró que la abundancia y densidad de esta población no es diferente entre melanoma acral o cutáneo (**Figura 7B y 7C**), pero sí representa diferencia en los pacientes MI, EM y LE (**Figura 7A, 7D y 7E**) respaldando la relación específica que tiene esta población en el control de la enfermedad.

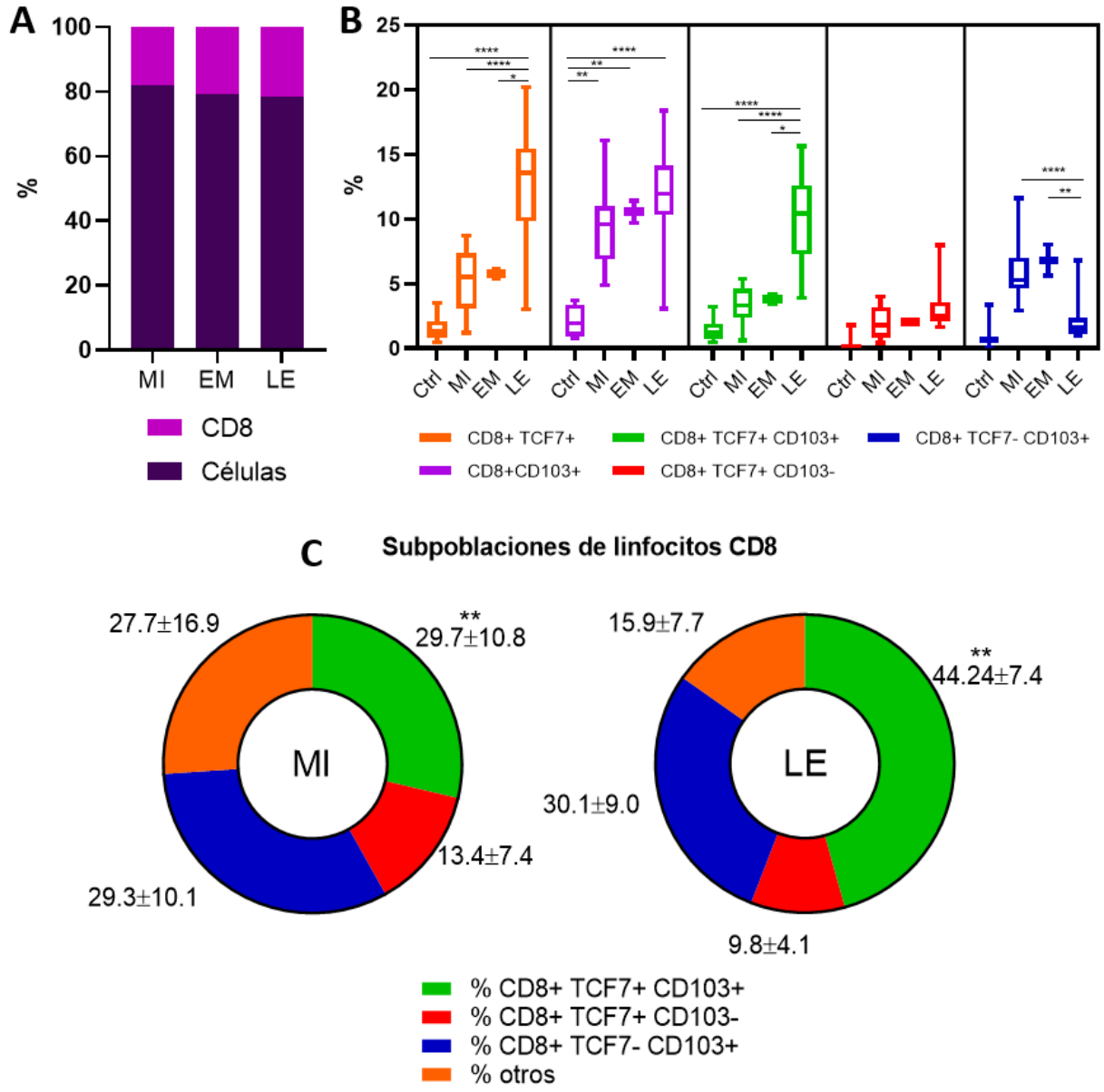


Figura 6. Linfocitos CD8 que expresan TCF7 y CD103 son el fenotipo de mayor importancia.

A Abundancia de linfocitos CD8 respecto al número total de células promedio por grupo de estudio **B** Gráfica porcentual para los fenotipos CD8+ TCF7+ (naranja) CD8+ CD103+ (magenta) CD8+ TCF7+ CD103+ (verde) CD8+ TCF7+ CD103- (rojo) CD8+ TCF7- CD103+ (azul). Porcentajes respecto al infiltrado en piel control (n=7) metastásicos iniciales (n=9) evolución a metástasis (n=2) y libres de enfermedad (n=22). Prueba ANOVA de una vía con comparación multiparamétrica * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 y **** p<0.0001 **C** Subpoblaciones linfocitos CD8 totales de acuerdo con el fenotipo indicado en los recuadros para pacientes libres de enfermedad (n=22) y metastásicos iniciales (n=9). Datos evaluados considerando únicamente evolución clínica y no tipo de melanoma.

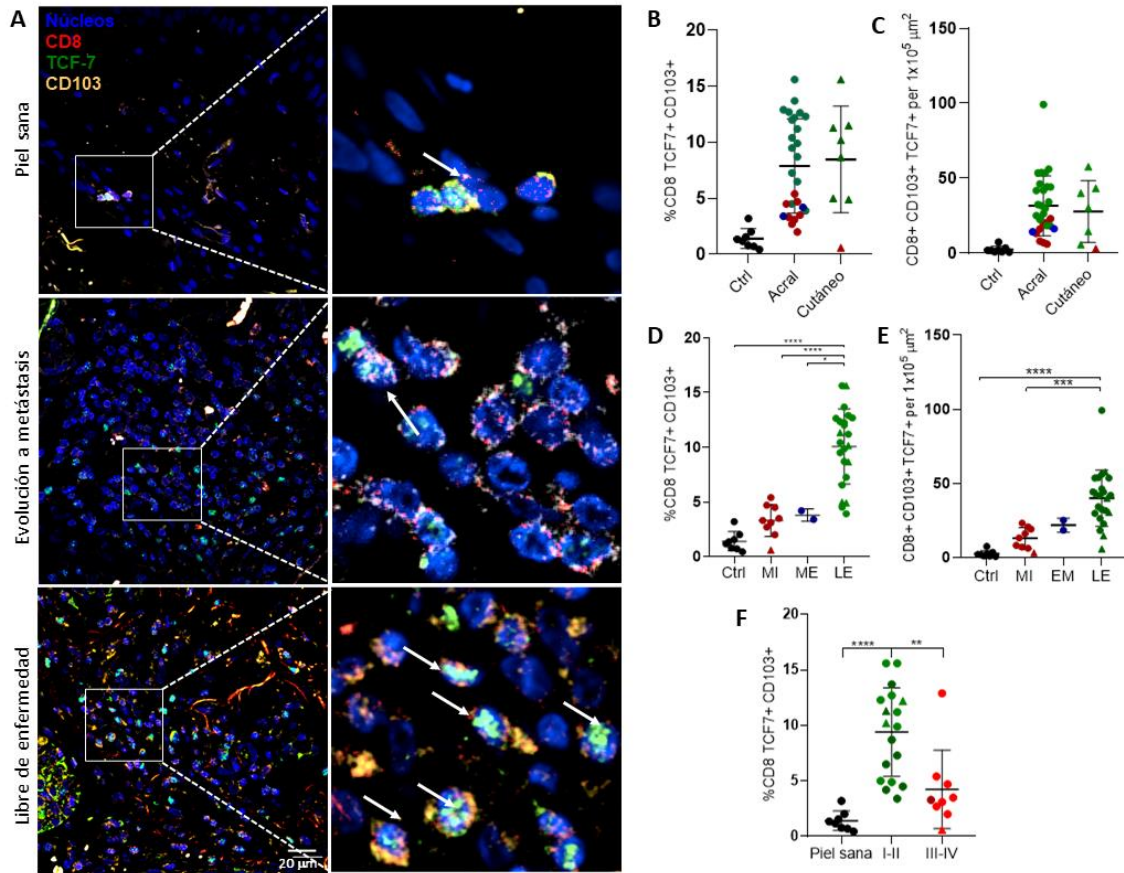


Figura 7. Linfocitos CD8 residentes de tejido que expresan TCF-7 se asocian con el control de melanoma.

Tinciones de inmunofluorescencia para **A** CD8 (rojo) TCF-7 (verde) CD103(amarillo) y núcleos (azul). Micrografías representativas del infiltrado de piel control, pacientes que evolucionaron a metástasis o permanecieron libres de la enfermedad tras dos años de seguimiento. Acercamiento del área seleccionada en blanco. Imágenes observadas a 20x y zoom digital 3x. (Barra de escala 20 μm) Pacientes de melanoma acral. **B** Porcentaje de linfocitos CD8+ TCF7+ CD103+ presentes en infiltrado inmune. **C** Densidad linfocitos CD8+ TCF7+ CD103+ por cada 1x10⁵ micrómetros cuadrados **B-C** cuantificaciones en piel control (n=7) melanoma acral (n=28) y melanoma cutáneo (n=8) **D** Porcentaje de linfocitos CD8+ TCF7+ CD103+ **E** Densidad linfocitos CD8+ TCF7+ CD103+ por cada 1x10⁵ micrómetros cuadrados **D-E** cuantificaciones piel control (negro, n=7) metastásico inicial (rojo, n=9), evolución a metástasis (azul, n=2) libres de enfermedad(verde, n=22) círculos melanoma acral triángulos melanoma cutáneo **F**. Porcentaje de linfocitos CD8+ de acuerdo con estadiaje. Estadio-I verde claro, n=10. Estadio-II verde oscuro, n=9. Estadio-III rojo, n=8. Estadio-IV vino, n=1. Prueba ANOVA de una vía con comparación multiparamétrica * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 y **** p<0.0001

Fenotipo de residencia de tejido en la población de interés.

Dada la expresión del marcador CD103 en la población celular evaluada, se buscó responder si esta población puede presentar características de residencia de tejido. Para responder esta interrogante se realizó una inmunofluorescencia multiplex t-CyCIF (tissue-based cyclic immunofluorescence) la cual permite evaluar más de tres marcadores en el tejido. Se buscó la expresión de dos factores de transcripción maestros en la residencia de tejido como Hobit y Runx3, además de la expresión de CD69, CD103 y adicionalmente el factor de transcripción TCF7, esto en un paciente LE de melanoma acral. De tal modo se logró observar que varias de las células que expresan CD103 y TCF7 sí presentan características fenotípicas de residencia de tejido en un paciente libre de enfermedad sugiriendo que el que esta población presente en el sitio tumoral podría ser importante en el control de la enfermedad (**Figura 8**). Cabe mencionar que en el futuro podría ser relevante si esto se observa en pacientes EM o MI y si el fenotipo de residencia se ve afectado en la progresión de la enfermedad.

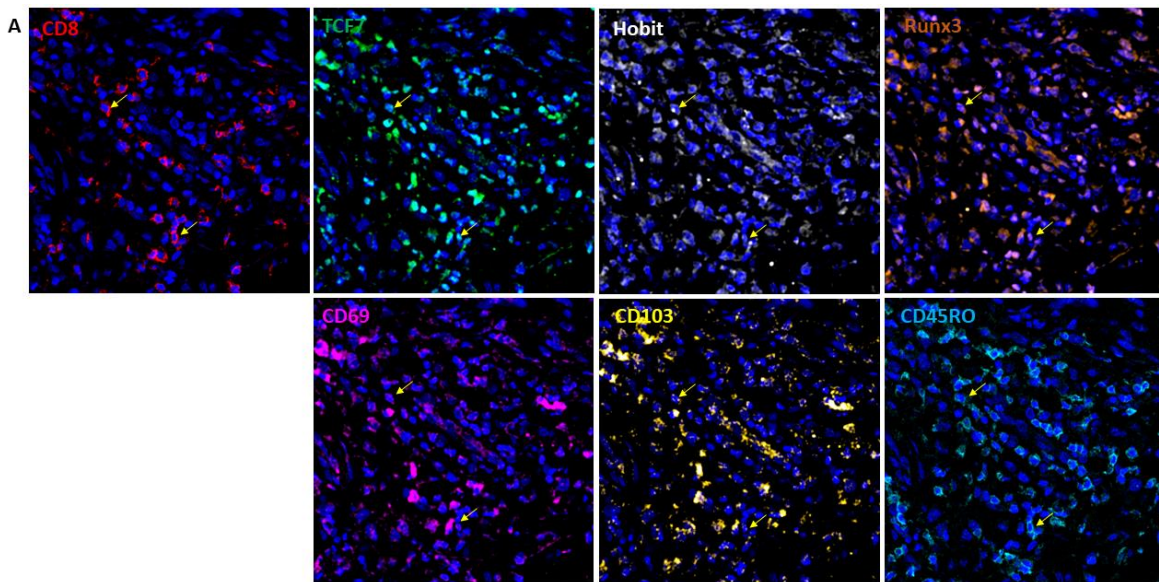


Figura 8. Linfocitos CD8 TCF7 CD103 expresan marcadores asociados a la residencia de tejido en un paciente libre de enfermedad

Tinciones de inmunofluorescencia para A CD8 (rojo) TCF-7(verde) Hobit (gris) Runx3 (naranja) CD69 (magenta) CD103 (amarillo) CD45RO (cyan) núcleos (azul). Micrografías representativas de un paciente libre de enfermedad. Las flechas amarillas señalan células que expresan los seis marcadores.

Evaluación de memoria y agotamiento en linfocitos T CD8 residentes de tejido.

Una vez obtenida esta información surgió la pregunta de si la población CD8+ CD103+ TCF7+ podría ser sólo una población de memoria y si podría representar a una población agotada. Se evaluó CD45RO como marcador de memoria y PD-1 como marcador de agotamiento. Se evidenció en un paciente LE de melanoma acral que en un mismo paciente existen linfocitos CD8+ CD103+ TCF-7+ PD-1- CD45RO+ y CD8+ CD103+ TCF-7+ PD-1+ CD45RO-, pero el fenotipo que parece predominar es CD8+ CD103+ TCF-7+ PD-1+ CD45RO+ (**Figura 9A**). Para confirmar que la población de interés si presentara características de agotamiento se extendió el panel de tinción, incluyendo TOX, TIM3 CXCR5 además de PD-1. Esto permitió observar que una gran parte de las células CD8 CD103 TCF7 expresan PD-1 TOX y CXCR5 pero no TIM3, sugiriendo que la población evaluada puede presentar características de progenitor agotado en los pacientes LE (**Figura 10A**). En conjunto, estos datos sugieren que linfocitos CD8 CD103 TCF7 son una población de memoria posiblemente agotada que podría estar asociada al control de la enfermedad en melanoma acral.

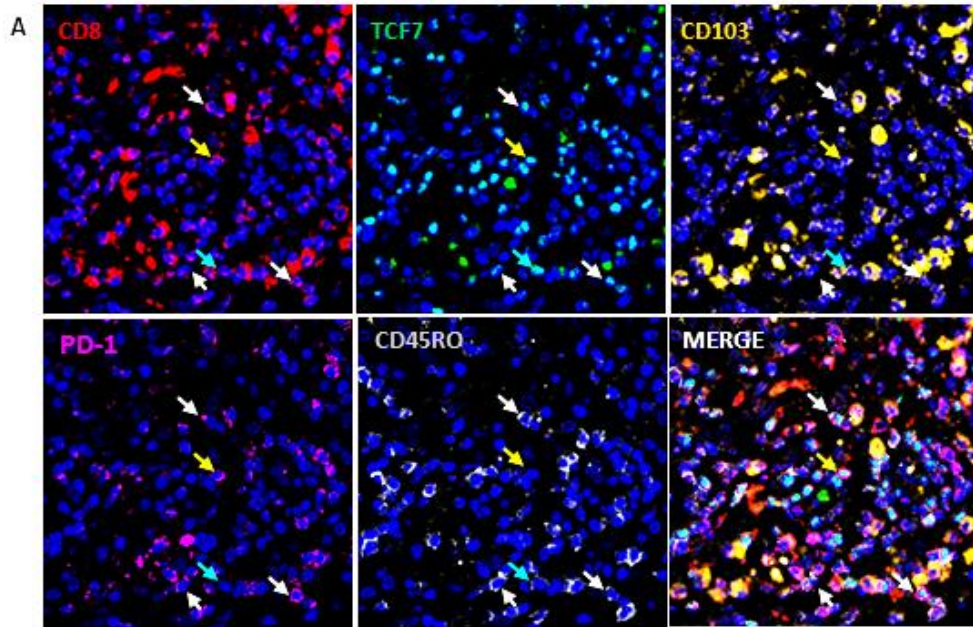


Figura 9. Linfocitos CD8 residentes de tejido que expresan TCF-7 y expresan marcadores de memoria agotada.

Tinción de inmunofluorescencia multiplex para CD8(rojo) TCF-7(verde) CD103(amarillo) PD1(magenta) CD45RO (gris) y la composición de los 5 canales. Las flechas blancas ejemplifican células positivas para los 5 marcadores. Las flechas amarillas ejemplifican al fenotipo que no expresa CD45RO. Las flechas cian células que no expresan PD-1. Micrografía representativa de un paciente libre de enfermedad.

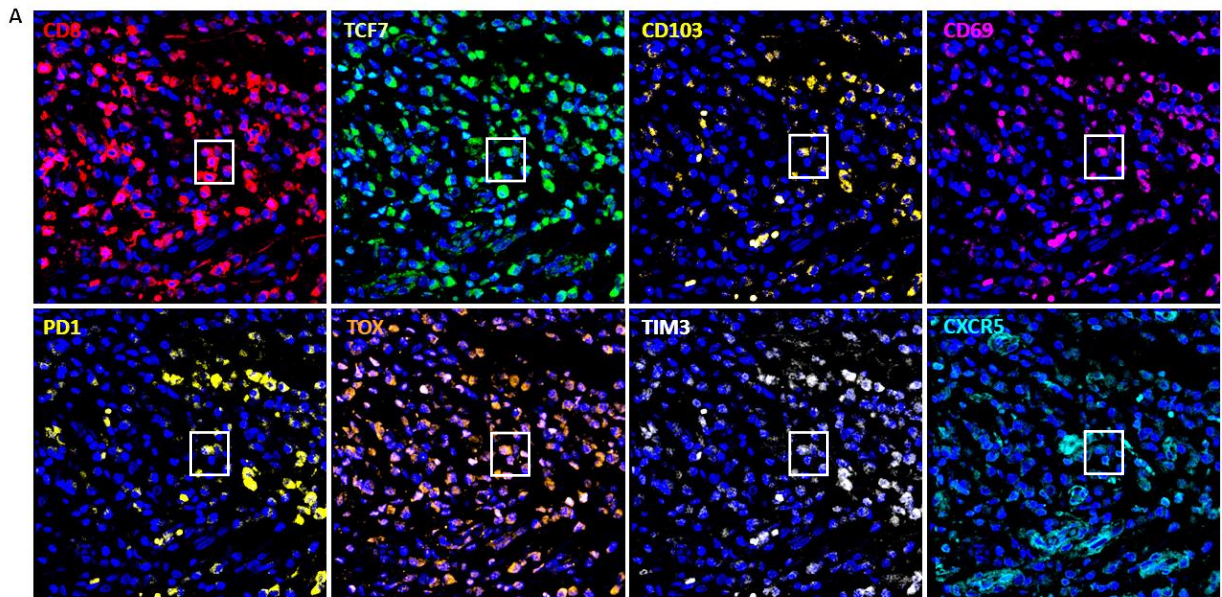


Figura 10. Linfocitos CD8 residentes de tejido que expresan TCF-7 expresan marcadores de agotamiento

A Tinción de inmunofluorescencia para CD8 (rojo) TCF-7(verde) CD103 (yellow hot) CD69 (magenta) PD-1 (amarillo) TOX (naranja) TIM3 (gris) CXCR5 (cyan) y núcleos (azul) para un paciente libre de enfermedad. El recuadro blanco ejemplifica células que expresan los 8 marcadores.

Evaluación de funcionalidad de linfocitos T CD8 residentes de tejido.

Posteriormente, al observar que la mayoría de los linfocitos CD8 CD103 TCF7 presentan un fenotipo precursor agotado, se evaluó si esta población pudiera ser funcional o estar proliferando. Buscando responder esta pregunta se evaluó la presencia de células que expresaran IFN- γ y/o KI-67 en un paciente LE de melanoma acral, encontrando que una gran proporción de las células pertenecientes al fenotipo de interés expresan IFN- γ y pocas el marcador que indica proliferación celular, KI-67. **(Figura 11A)**. Esta información sugiere que la población de interés puede presentar características funcionales por la producción de IFN- γ , sin embargo, con un perfil quiescente, probablemente relacionado al mantenimiento de la población en el tejido en sujetos libres de la enfermedad en melanoma acral.

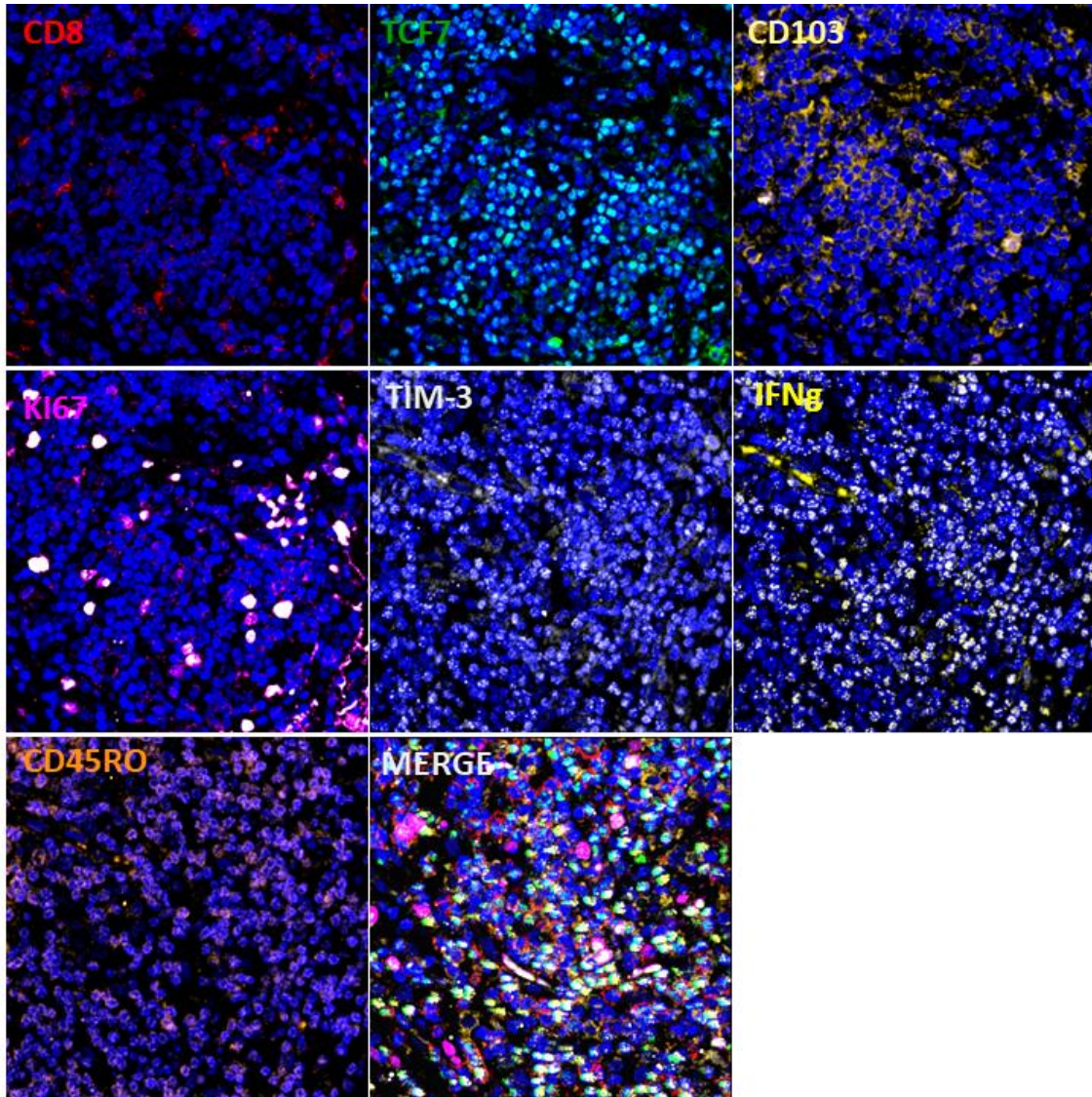


Figura 11. Linfocitos CD8 residentes de tejido que expresan TCF7 podrían ser una población agotada con características de función en pacientes libres de enfermedad

A Tinción de inmunofluorescencia para CD8 (rojo) TCF-7(verde) CD103 (yellow hot) KI67 (magenta) TIM3 (gris) IFN- γ (amarillo) CD45RO (naranja) CXCR5 (cyan) y núcleos (azul) para un paciente libre de enfermedad.

Relación de linfocitos CD8 con variables clínicas.

Posteriormente, una vez observada la relación de la población CD8 CD103 TCF7 con el control de la enfermedad, se buscó responder si ésta también pudiera tener relación con las variables clínicas de los pacientes. Para ello se realizó una regresión lineal entre la abundancia de la población de interés con el índice de Breslow reportado. Este análisis permitió encontrar que un mayor porcentaje de células CD8+CD103+TCF-7+ se relaciona con un menor índice de Breslow, el cual hace referencia a la invasividad del melanoma en la piel, sin embargo, esta relación no es tan fuerte. Dicha evidencia podría sugerir que linfocitos CD8 con fenotipo CD103+ TCF-7+ podrían estar relacionados directamente al control de la enfermedad, sin embargo, esta relación parece no ser tan fuerte, destacando la importancia de seguir profundizando en el fenotipo de la población, así como su relación con otros factores clínicos (**Figura 12A**). Podría ser relevante evaluar en el futuro si este comportamiento se conserva evaluando casos acrales y cutáneos por separado.

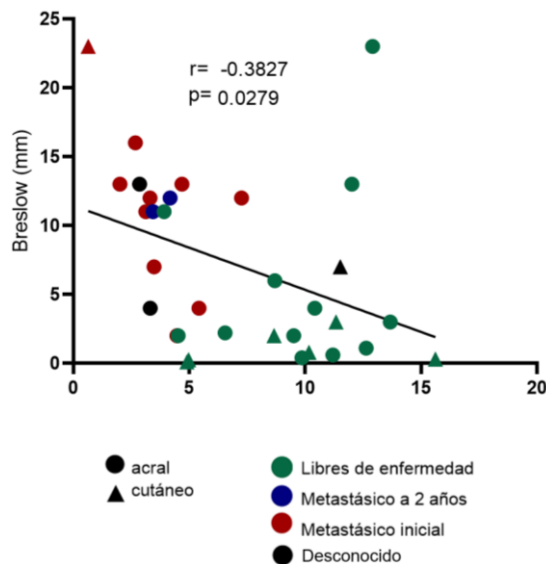


Figura 12. Relación entre la población CD8 TCF7 CD103 con el índice de Breslow

(A) Gráfica que muestra la relación entre el índice de Breslow (mm) y la población CD8+ CD103+ TCF-7+ incluyendo pacientes MI, EM y LE. Regresión lineal simple y análisis de correlación de Pearson. * $p < 0.05$

Evaluación de abundancia y densidad de cDC1 en el infiltrado tumoral de melanoma.

Teniendo en cuenta la importancia de las células dendríticas al activar la respuesta de los linfocitos T, nos preguntamos si esta población podría encontrarse presente en el infiltrado tumoral. Para ello se realizaron tinciones de inmunofluorescencia en la misma cohorte donde se evaluaron a los linfocitos CD8 CD103 TCF7, identificando a las cDC1 mediante la expresión de los marcadores CD11c, HLA-DR y BDCA-3. El análisis permitió observar que no hay diferencias en abundancia y densidad de esta población comparando melanoma acral y cutáneo (**Figura 13B**) sugiriendo que a pesar de que estos dos tipos de melanoma podrían ser diferentes genética e histológicamente despiertan una respuesta inmune que es similar en ambos tipos de melanoma. Además, se observó mayor abundancia y densidad de estas cDC1 en los pacientes libres de enfermedad con respecto a los que evolucionaron a metástasis y metastásicos iniciales considerando melanoma acral y cutáneo (**Figura 13A, 13D y 13E**). Esta información podría sugerir que en los pacientes que no desarrollan metástasis se despierta una respuesta más abundante de células dendríticas, siendo evidente que esta respuesta se ve disminuida en etapas más avanzadas de la enfermedad (**Figura 13F**)

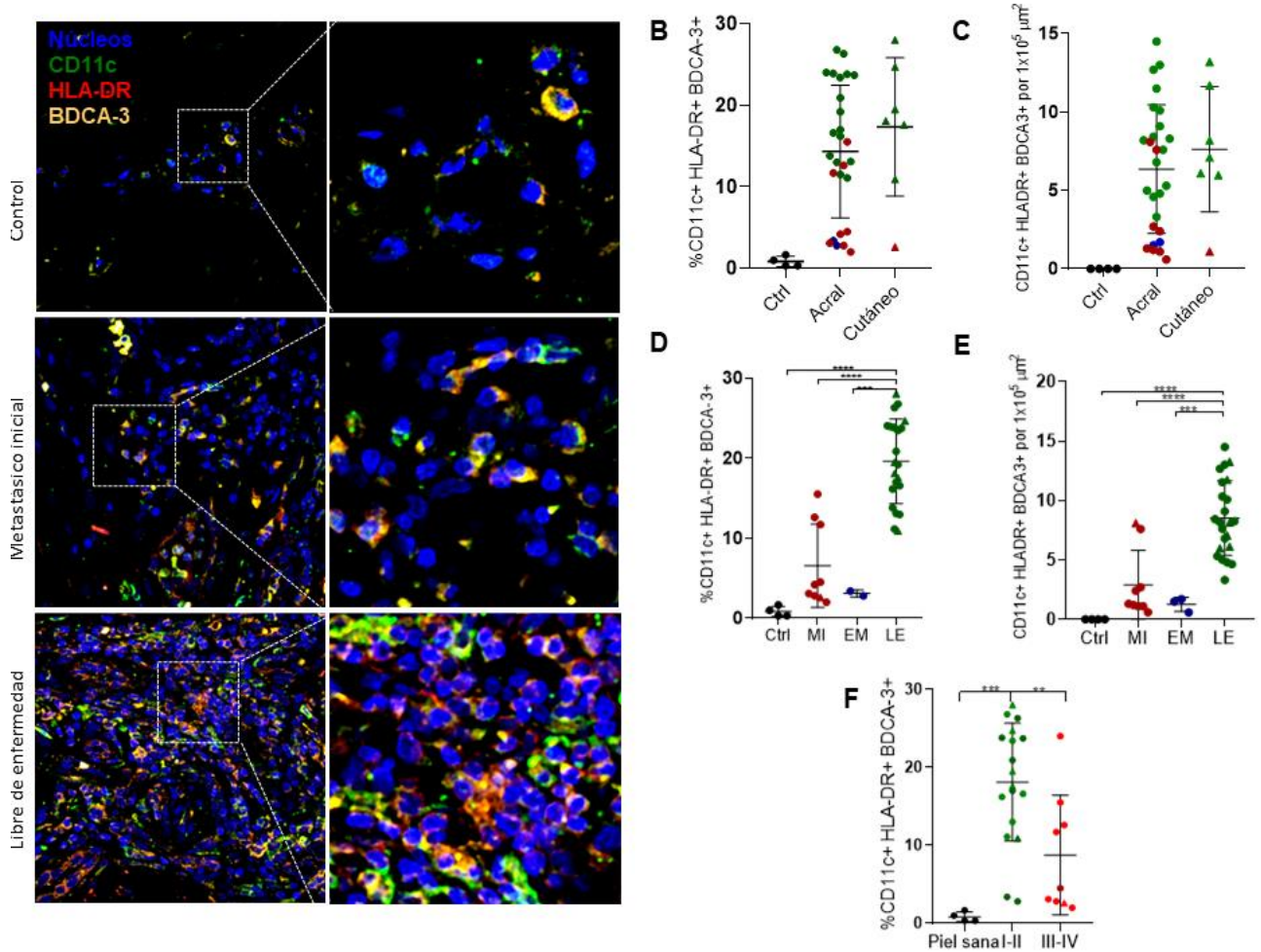


Figura 13. Mayor abundancia de cDC1 se relaciona con el control de la enfermedad.

Tinciones de inmunofluorescencia para (A) CD11c (verde), HLA-DR (rojo) BDCA-3 (amarillo) y núcleos (azul); Micrografías representativas del infiltrado de piel control, de pacientes que evolucionaron a metástasis o permanecieron libres de la enfermedad tras dos años de seguimiento de melanoma acral. Acercamiento del área seleccionada en blanco. Imágenes observadas a 20x y zoom digital 3x. (Barra de escala 20 μm). B Porcentaje células CD11c+ HLA-DR+ BDCA-3+ presentes en infiltrado inmune. C Densidad células CD11c+ HLA-DR+ BDCA-3+ por cada 1x10⁵ micrómetros cuadrados B-C cuantificaciones en piel control (n=7) melanoma acral (n=28) y melanoma cutáneo (n=8) D Porcentaje de células CD11c+ HLA-DR+ BDCA-3+ E Densidad células CD11c+ HLA-DR+ BDCA-3+ por cada 1x10⁵ micrómetros cuadrados D-E cuantificaciones piel control (negro, n=7) metastásico inicial (rojo, n=9), evolución a metástasis (azul, n=3) libres de enfermedad (verde, n=22) F. células CD11c+ HLA-DR+ BDCA-3+ de acuerdo con estadiaje. Estadio-I verde claro, n=10. Estadio-II verde oscuro, n=9. Estadio-III rojo, n=8. B-F círculos= melanoma acral triángulos=melanoma cutáneo Estadio-IV vino, n=1. Prueba ANOVA de una vía con comparación multiparamétrica * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 y **** p<0.0001

Presencia de células dendríticas clásicas tipo 1 en ganglios centinelas de pacientes con melanoma.

Buscando dilucidar por qué hay diferencias en la abundancia de cDC1, se evaluó dicha población en los ganglios centinelas de pacientes libres de enfermedad y de pacientes cuya metástasis ya estaba en el ganglio de pacientes con melanoma acral. De tal modo se encontró que los pacientes en remisión tenían mayor abundancia de células CD11c+ HLA-DR+ BDCA-3+ en el ganglio respecto a los pacientes metastásicos (**Figura 14 A y 14B**) lo cual podría indicar que la falta de infiltrado en los pacientes metastásicos se debe a la poca presencia de cDC1 en los ganglios linfáticos. Este análisis se realizó buscando a la población CD8+ CD103+ TCF7+, sin embargo, como ya era esperado, en el ganglio no se encontró que expresaran CD103 dejando evidente que es necesario encontrar marcadores que permitan evaluar que sucede con esta población fuera de la piel.

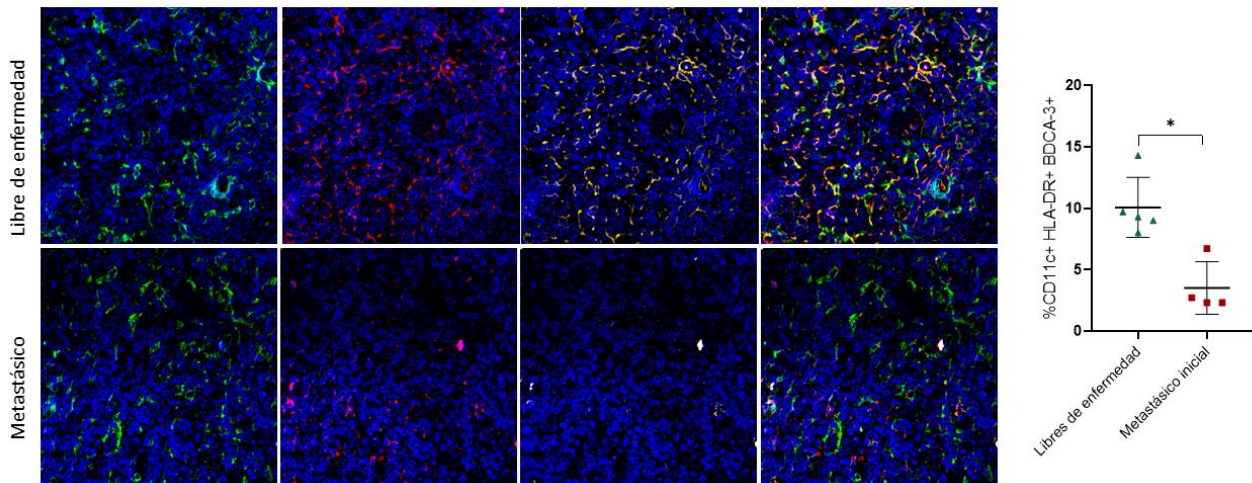


Figura 14. Mayor abundancia de cDC1 en ganglio linfático drenante se relaciona con el control de la enfermedad. Tinciones de inmunofluorescencia para (A) CD11c (verde), HLA-DR (rojo) BDCA-3(amarillo) y núcleos (azul); Micrografías representativas del infiltrado de ganglios centinela de pacientes que evolucionaron a metástasis o permanecieron libres de la enfermedad tras dos años de seguimiento de melanoma acral. Acercamiento del área seleccionada en blanco. Imágenes observadas a 20x y zoom digital 3x. (Barra de escala 20 μ m). Porcentajes de células (B) CD11c+ HLA-DR+ BDCA-3+ cuantificados en pacientes de evolución a metástasis (n=4) y libres de enfermedad (n=5). Prueba T no pareada *p<0.05

Fenotipo de células dendríticas clásicas tipo 1 en infiltrado de pacientes con melanoma.

Una de las características más relevantes de las células dendríticas es la capacidad que tienen de modular la respuesta inmune, ya sea activando la respuesta de linfocitos T o regulando su respuesta. Es por ello que en las cDC1 encontradas se buscó evaluar el perfil funcional de esta población, buscando responder si tienen fenotipo activador o regulador, esto a través de la expresión de moléculas de coestimulación como CD40 o de PD-L1. Esto permitió observar mayor porcentaje de cDC1 CD40 positivas en los pacientes que no evolucionaron a metástasis comparado a los MI o EM de pacientes con melanoma acral y cutáneo (**Figura 15A y 15B**). Esto sugiere que en estos pacientes las células dendríticas están participando, promoviendo la respuesta anti-tumoral. De manera importante, también se encontró que los pacientes libres de enfermedad tenían un alto porcentaje de cDC1 PD-L1+, sugiriendo que de alguna forma este fenotipo junto con las CD40+ están relacionados al control de la enfermedad (**Figura 15C y 15D**).

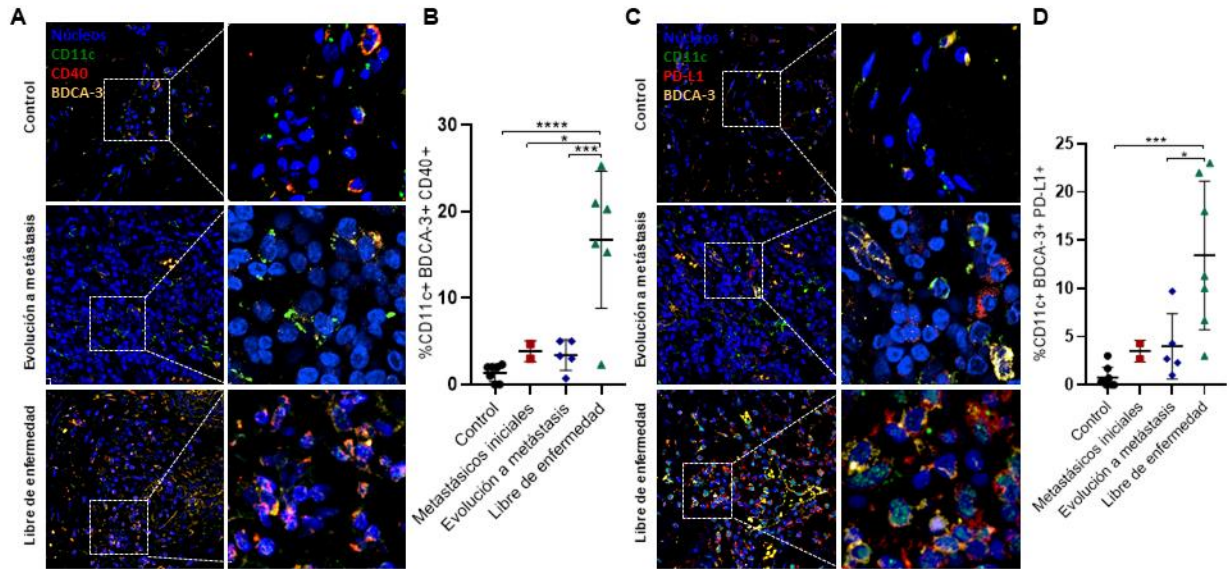


Figura 15. Fenotipo activador e inhibidor de las células dendríticas clásicas tipo 1 se encuentra incrementado en los pacientes libres de enfermedad.

Tinciones de inmunofluorescencia para **(A)** CD11c (verde), CD40 (rojo) BDCA-3(amarillo) y núcleos (azul). **(C)** CD11c (verde), PD-L1 (rojo) BDCA-3(amarillo) y núcleos (azul). **(B)** CD11c+ CD40+ BDCA-3+ **(D)** CD11c+ PD-L1+ BDCA-3+ cuantificados en sujetos control (n=7) metastásicos iniciales (n=2) pacientes de evolución a metástasis (n=5) y libres de enfermedad (n=6). Prueba ANOVA de una vía con comparación multiparamétrica * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 y **** p<0.0001

Perfiles específicos de cDC1 relacionados al control del melanoma.

Al observar que tanto el perfil activador e inhibidor de las cDC1 se encuentran en mayor abundancia en los pacientes libres de enfermedad de pacientes con melanoma acral y cutáneo, nos preguntamos si las células observadas podrían estar co-expresando estos marcadores o existen poblaciones definidas en los diferentes grupos de estudio. Para ello mediante inmunofluorescencia multiplex se observó que existe una población CD40+ PD-L1+ presente en el microambiente tumoral que es más abundante en los LE, además de manera interesante la población que no expresa CD40 pero sí PD-L1 también parece ser relevante en los pacientes que controlan la enfermedad (**Figura 16C**). En un principio este resultado podría ser explicado por la mayor abundancia de cDC1 en el tejido de estos pacientes comparado a los MI (**Figura 16A,16B**) por lo que se evaluó específicamente la proporción de los diferentes fenotipos observados con respecto a la cantidad de cDC1. De este modo se encontró que la diferencia más sustancial entre los pacientes era el predominio de PD-L1+CD40- cDC1 en los pacientes libres de enfermedad (32,5% vs 16,7%; **Figura 16D**). Adicionalmente se evaluó la expresión de CD40 y PD-L1 utilizando la intensidad media de fluorescencia, observando que casi todas las células doblemente positivas eran CD40 altas en los pacientes libres de enfermedad (**Figura 16E**), mientras que los pacientes metastásicos eran CD40 bajo. Asimismo, las células cDC1 CD40 PD-L1 positivas tenían un subconjunto de PD-L1 bajo en los pacientes LE, comparado a los MI (**Figura 16F**). No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de CD40 y PD-L1 en los cDC1 positivos simples (**Figura 16G, 16H**). En conjunto, estos datos sugieren que existe una dinámica compleja en la expresión tanto de moléculas de cosestimulación positiva y negativa y que existe predominio de un papel activador de los cDC1 doble positivos en los pacientes libres la enfermedad, y un papel más tolerogénico en los pacientes con metástasis

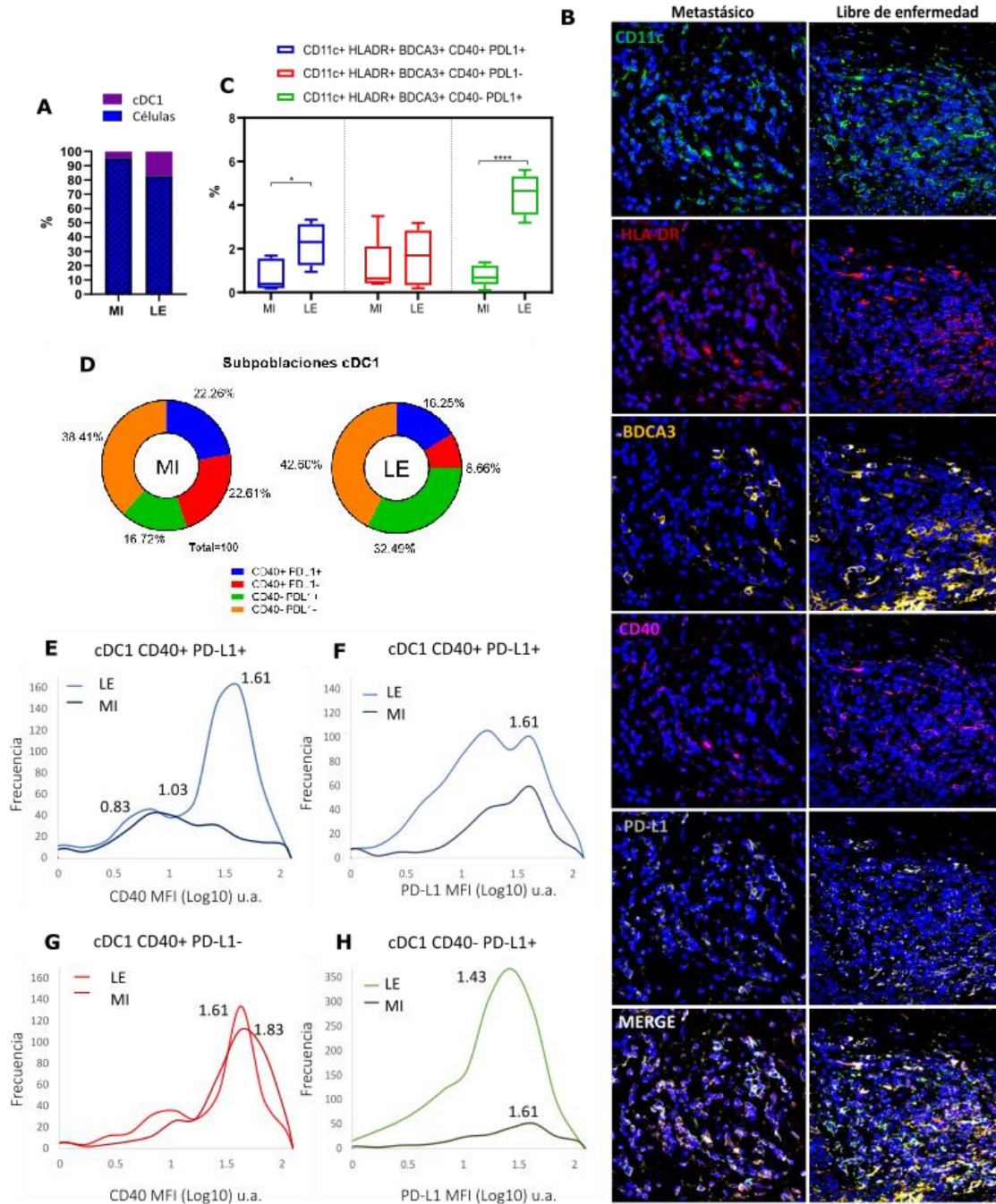


Figura 16. Células dendríticas clásicas tipo 1 expresan CD40 y PD-L1.

A Abundancia de cDC1 respecto a células totales en campos altamente infiltrados. **B** Micrografías representativas de inmunofluorescencia multiplexada para CD11c (verde), HLA-DR (rojo), BDCA-3 (amarillo), CD40 (magenta), PD-L1 (gris) y núcleos (azul) en pacientes metastásicos (MI, n=5) y libres de enfermedad (LE, n=5). **C** Abundancia de diferentes células cDC1 (CD11c+ HLA-DR+ BDCA-3+) que expresan CD40, PDL1 o ambos marcadores. Los porcentajes se estimaron con respecto a todas las células nucleadas en la imagen incluyendo tres campos por paciente. **D** Gráficos circulares de las subpoblaciones de cDC1 en función de la expresión de PD-L1 y CD40. **E-H** Intensidad de fluorescencia media normalizada **E,G** para CD40 o **F,H** PD-L1 en cDC1 **E-F** dobles positivos **G** CD40+ PD-L1- y **H** CD40- PD-L1+ Unidades de fluorescencia arbitrarias Escala Log10. Los datos estadísticos fueron agrupados de los pacientes utilizando la prueba t de Student, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 y **** p<0.0001

Posteriormente se eligieron tres pacientes libres de enfermedad y tres metastásicos para evaluar la expresión de otras moléculas, buscando explorar más a fondo el perfil activador o inhibidor de las cDC1 observadas. Se seleccionaron dos marcadores de activación IL-12 y CD86, y la molécula inhibidora IDO, para un total de nueve parámetros en la misma imagen de fluorescencia multiplexeada. Cuando se analizaron los subconjuntos de las cDC1 CD40+ PD-L1+, se observó que los pacientes libres de enfermedad tienen un predominio de un fenotipo que expresa IL12, CD86 e IDO, destacando la importancia de estudiar en profundidad. Además, se encontró una mayor proporción de células que expresan los marcadores de activación CD86 e IL-12 en los pacientes LE, comparado a los pacientes MI donde esta población es la menos abundante (**Figura 17B**). Por el contrario, el subconjunto más abundante en los pacientes metastásicos iniciales fue cDC1 IL-12- CD86-IDO+. De manera interesante, cuando se evaluó a las cDC1 CD40- PD-L1+, también se observó un enriquecimiento significativo de subpoblaciones que expresaban los marcadores de activación sin expresión de IDO en los pacientes libres de enfermedad (**Figura 17C, 17D**), mientras que lo contrario se observó en los pacientes metastásicos, en los que el subconjunto CD86- IL-12- IDO+ cDC1 estaba enriquecido.

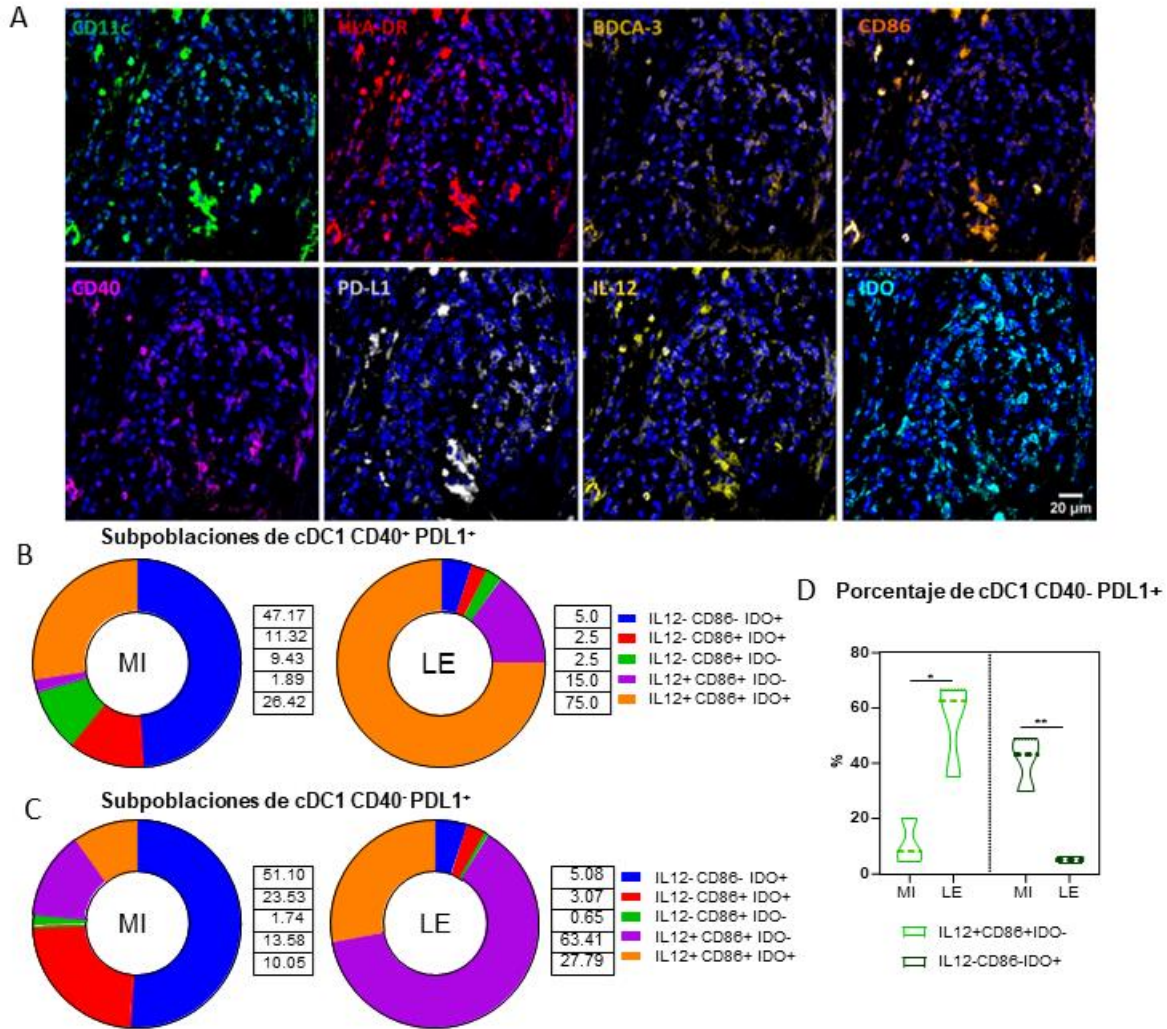


Figura 17. Las cDC1 presentes en el infiltrado tumoral tienen un fenotipo predominantemente activador en pacientes libres de la enfermedad.

A. Micrografías representativas de inmunofluorescencia multiplexada para CD11c (verde), HLA-DR (rojo), BDCA-3 (amarillo caliente), CD86 (naranja), CD40 (magenta), IL-12 (amarillo), PD-L1 (gris), IDO (cian) y núcleos (azul) en un paciente sin enfermedad. **B** Porcentaje de cDC1 que expresan los marcadores IL-12+ CD86+ IDO-, IL-12- CD86+ IDO+ e IL-12+ CD86+ IDO+; para cada comparación el 100% fue el total de B cDC1 CD40+ PD-L1+ C CD40- PD-L1+. **D** Análisis porcentual de las poblaciones IL-12+ CD86+ IDO- y IL-12- CD86- IDO+ de CD40- PD-L1+ cDC1s (como en C). Los datos estadísticos se agruparon de los pacientes MI (n=3), LE (n=3) utilizando la prueba t de Student. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 y **** p<0.0001

Relación entre linfocitos CD8 CD103 TCF7 y cDC1

Al encontrar que tanto las cDC1 como los linfocitos CD8 CD103 TCF7 se encuentran en mayor abundancia en pacientes LE, nos preguntamos si estas dos poblaciones pueden estar relacionadas entre ellas. Para ello se realizaron regresiones lineales y análisis de correlación con los porcentajes de población de cada paciente. Se encontró que una mayor cantidad de cDC1 correlacionan con un mayor porcentaje de linfocitos CD8+CD103+TCF-1+ (**Figura 18A**) sugiriendo que la presencia de ambas poblaciones en conjunto está relacionada con el control de la enfermedad, ya que la mayoría de los pacientes MI y EM tienen poca abundancia de estas dos poblaciones. Cabe mencionar que esta relación se observa únicamente cuando se incluyen todos los pacientes de melanoma acral y cutáneo, así como los tres grupos de estudio.

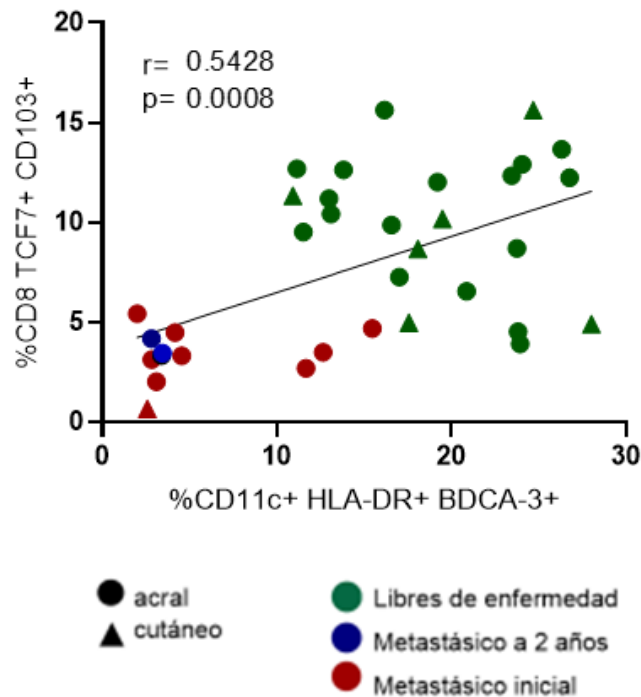


Figura 18. Relación entre células dendríticas clásicas tipo 1 y linfocitos T CD8 residentes de tejido que expresan TCF7

Gráficas que muestran la correlación de (A) Porcentaje de células CD8+ CD103+ TCF7+ vs CD11c+ HLA-DR+ BDCA3+ Datos en rojo pacientes metastásicos iniciales, azul de evolución a metástasis y verde libres de enfermedad. Regresiones lineales simples y análisis de correlación de Pearson.

Distribución de la población CD8 CD103 TCF7 en el tejido.

Al encontrar que los linfocitos CD8 CD103 TCF7 se encuentran en mayor abundancia en pacientes LE comparado a los MI, nos preguntamos cómo se distribuyen estas células en el tejido y si esto es diferente entre los grupos de estudio. De tal modo, se realizó un escaneo de tejido completo de la tinción de inmunofluorescencia CD8+ CD103+ TCF7+ en un paciente MI cutáneo y uno LE acral, lo cual permitió observar que esta población se encuentra de manera organizada, formando "nichos" o agrupaciones en los pacientes libres de enfermedad; por otro lado, en los pacientes metastásicos, aunque la población está presente, es poco abundante y no se encuentra organizada, sino que muestra un patrón disperso a lo largo del tejido. (**Figura 19A**). Podría ser relevante estudiar en el futuro si estas agrupaciones tienen un impacto directo en el control de la enfermedad, así como los mecanismos por los cuales se forman o mantienen en el tejido.

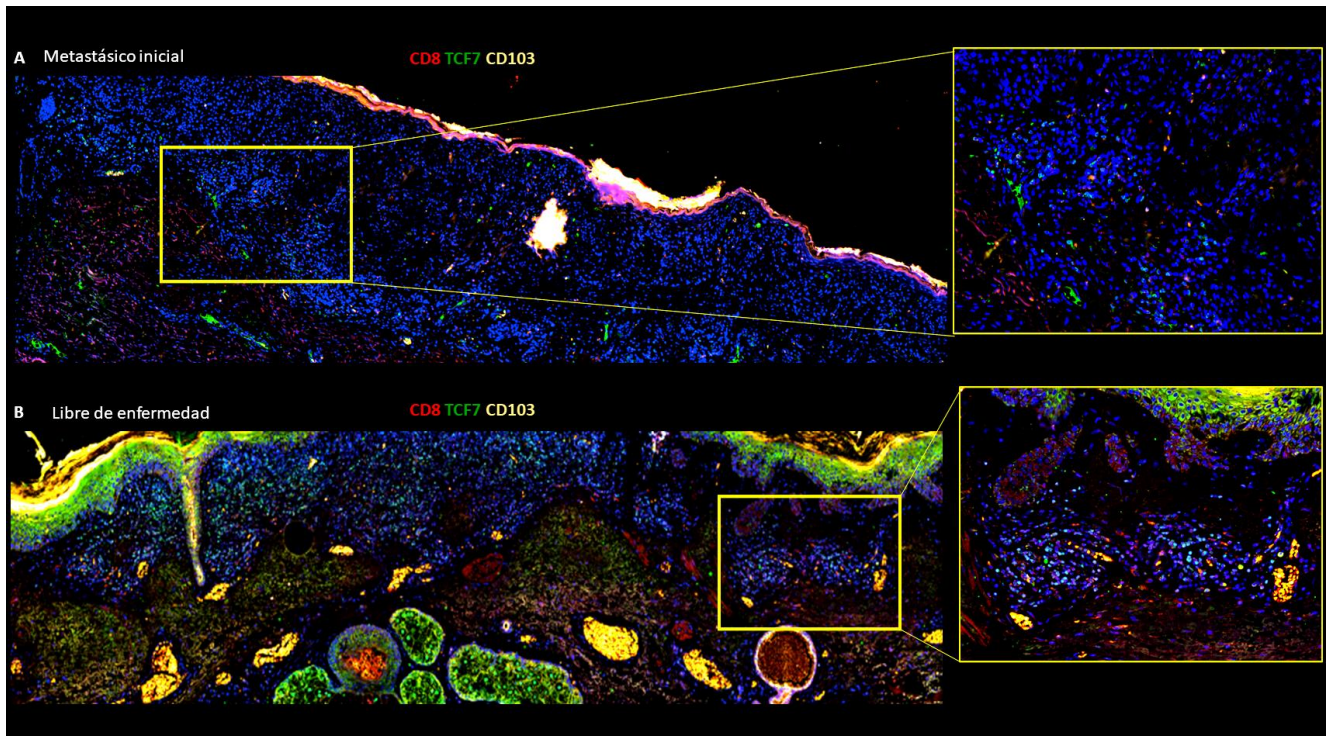


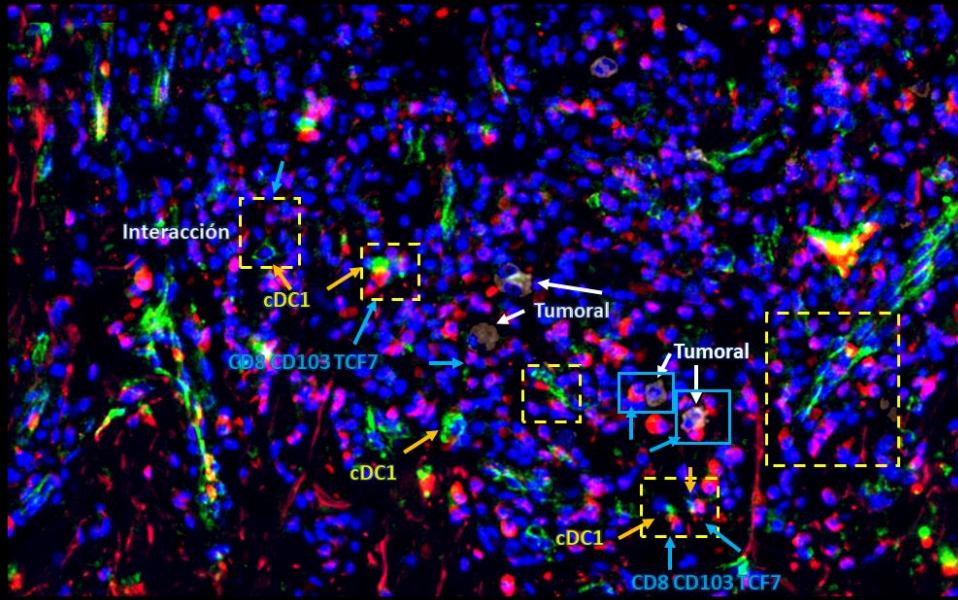
Figura 19. Linfocitos CD8 residentes de tejido que expresan TCF-7 se encuentran en agrupaciones en pacientes libres de enfermedad

Micrografías que muestran escaneo completo de producto de resección para la tinción de inmunofluorescencia para CD8 (rojo) TCF-7(verde) CD103(amarillo) y núcleos (azul) para **A** MI (cutáneo) y **B** LE (acral). Acercamiento del área seleccionada en amarillo que muestra área cercana al área de transformación. El área de transformación, así como las áreas de infiltrado fueron localizadas utilizando la tinción H&E como guía de acuerdo con características histopatológicas.

Localización e interacción de linfocitos CD8 CD103 TCF7 y cDC1 en sitio tumoral.

La correlación de los linfocitos CD8 de interés con las cDC1 nos hizo preguntarnos si estas dos poblaciones podrían estar coexistiendo en la misma localización en el tejido y cuál es su relación espacial con el tumor. Para ello se evaluaron los marcadores de cDC1 y CD8 CD103 TCF-7 así como el marcador tumoral HMB-45(Pmel17). Para facilitar de visualización de las distintas poblaciones, las señales se simplificaron mediante operaciones matemáticas, limpiando la señal y evidenciando áreas de coincidencia para cada subconjunto específico. Este análisis permitió observar en un paciente libre de enfermedad de melanoma acral zonas donde las cDC1 podrían estar interactuando con los CD8 CD103 TCF7 y estos a su vez con las células transformadas (**Figura 20A, 20B**). Adicionalmente, se transformó la información obtenida a un plano cartesiano, evidenciando al menos 3 zonas principales, una zona de tumor, en la periferia áreas de interacción T-Tumor T-DC o T-DC y en áreas más alejadas zonas de interacción T-DC (**Figura 20C**). Esta información sugiere que las dos poblaciones inmunes evaluadas están relacionadas al control de la enfermedad no sólo debido a su mayor abundancia en estos pacientes, sino porque tienen una estrecha relación entre ellas en áreas cercanas al tumor.

A CD8 TCF7 CD103 CD11c HLADR BDCA3 HMB-45



B CD8 TCF7 CD103 CD11c HLADR BDCA3 HMB-45

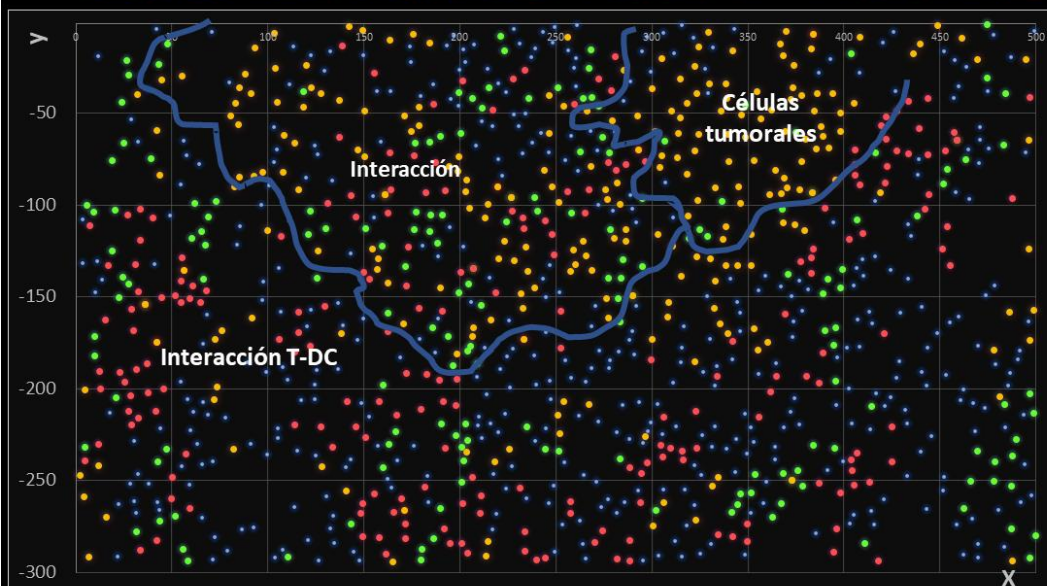
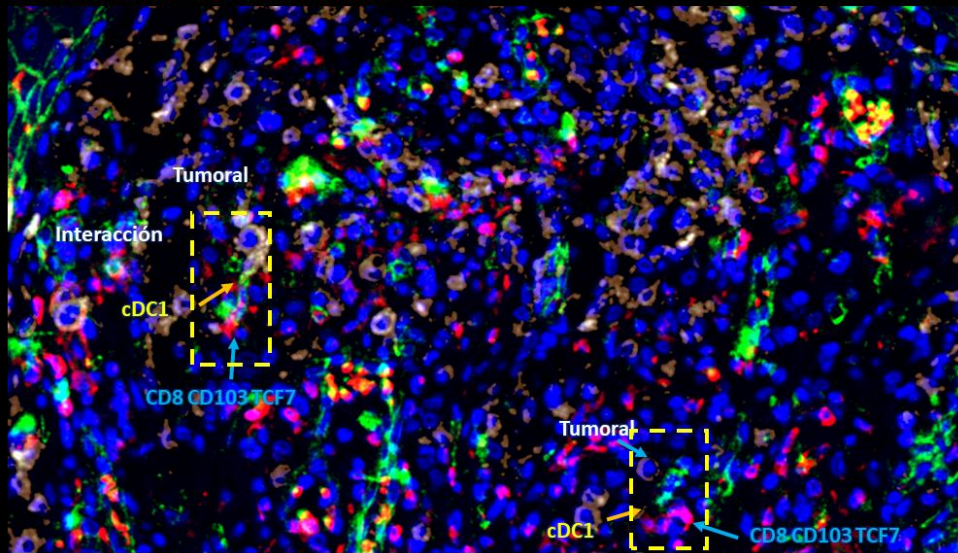


Figura 20. Los linfocitos CD8 residentes de tejido TCF7 y las cDC1 se encuentran en estrecha relación en áreas cercanas al tumor

A Tinciones de inmunofluorescencia multiplex para CD8 TCF-7 CD103(rojo) HMB-45(sepia) y CD11c HLA-DR BDCA-3 (verde). La señal roja mostrada proviene de simplificar los canales CD8 TCF7 y CD103 mediante operaciones matemáticas que permiten amplificar zonas de coincidencia. La señal verde se obtuvo del mismo modo utilizando los marcadores CD11c HLA-DR y BDCA3. Las flechas blancas señalan células transformadas (positivas para HMB-45). Las flechas azules indican células CD8 Trm TCF-7. Las flechas amarillas indican células cDC1. Los cuadros azules muestran zonas con los linfocitos T están en contacto con células tumorales. Los cuadros punteados amarillos muestran zonas donde hay cercanía entre cDC1 y linfocitos Trm. **B** Tinción de Tinciones de inmunofluorescencia multiplex para CD8 TCF-7 CD103(rojo) HMB-45(sepia) y CD11c HLA-DR BDCA-3 (verde) y transformación de las células a un plano cartesiano. Zonas de interacción indicadas.

IX. DISCUSIÓN

El melanoma es el cancer de piel más mortal, ya que representa 80% de las muertes asociadas a cáncer de piel, mostrando sobrevida a 5 años de menos del 25% a nivel mundial y menos del 15% en nuestro país, si se diagnostica en etapa avanzada. La evidencia señala que tanto la incidencia como la mortalidad han aumentado a lo largo del tiempo y la OMS estima que estas tasas seguirán creciendo en el futuro, tanto para México como para todo el mundo.

El sistema inmune y su estudio en el microambiente tumoral ha sido uno de los acercamientos más importantes para entender factores asociados al control y progresión de la enfermedad, ya que en los casos ideales éste será capaz de controlar al tumor y generar protección frente a la enfermedad.

A pesar de que sabe que el melanoma es un tumor donde el sistema inmune es de gran relevancia debido a su inmunogenicidad, se desconoce el fenotipo de poblaciones específicas que pueden estar relacionadas al control de la enfermedad. Actualmente existen descripciones que separan los fenotipos a nivel genético sin evaluar a nivel proteómico a las poblaciones, así como su relación y distribución espacial con respecto al tumor, por lo cual hacer una descripción profunda del fenotipo de las poblaciones inmunes puede ser relevante en el estudio de los factores asociados al control de la enfermedad, así como entender porque algunos pacientes no logran dicho control.

El melanoma acral es una forma poco frecuente en países con población predominantemente caucásica como Estados Unidos y Europa, contrario a México donde esta forma de la enfermedad es la más representada con 54% de los casos.

Uno de los primeros hallazgos que se destacó en el presente estudio es la alta incidencia de melanoma acral, ya que se encontró que es mayor a lo ya reportado en nuestro país (54% vs 78%)¹⁰ indicando que es posible que la estadística este subestimando la verdadera distribución de esta forma de la enfermedad y demostrando que existe una distribución diferente en población mexicana. Los factores asociados a esta distribución aún son desconocidos, así como las diferencias de comportamiento que puede tener el sistema inmune frente a estos dos tipos de melanoma. En este trabajo se pudo observar que aunque la literatura refiere que estos dos tipos de melanoma son diferentes genéticamente^{14,55}, así como a nivel histológico, pueden comportarse de manera similar a nivel de infiltrado CD8 y cDC1 sin considerar su perfil funcional. Lo anterior sugiere que la respuesta inmune parece ser independiente de la forma de melanoma que se esté observando, sin embargo, resta evaluar si esta observación es válida para otras poblaciones inmunes, así como otros fenotipos y qué está determinando estas similitudes.

Los linfocitos CD8 son una de las poblaciones más importantes en el contexto tumoral gracias a la capacidad citotóxica específica que tienen frente a células transformadas⁵⁶. De tal modo, la respuesta de los linfocitos T CD8 se ha asociado con un mejor pronóstico en varios tipos de cáncer^{57,58}. A pesar de ello, se observó que el sólo conocer la cantidad de linfocitos CD8 de un paciente con melanoma no es suficiente para distinguir a pacientes metastásicos iniciales de los de evolución a metástasis o libres de enfermedad. Esto deja claro que la relación CD8 con buen pronóstico es más compleja de lo que se pensaba y que es necesario estudiar a profundidad los fenotipos de las distintas poblaciones y sus funciones en el infiltrado tumoral.

De acuerdo con antecedentes directos del presente estudio, linfocitos CD8 que pueden expresar CD103 o TCF7, son importantes en la inducción de respuesta al tumor con el uso de adyuvantes en modelos murinos de melanoma³⁰, así como evidencia que señala por un lado la importancia de linfocitos Trm o linfocitos TCF7 en respuesta a inmunoterapia^{59,60}. En el presente trabajo se logró evidenciar la

relevancia que tienen los linfocitos T CD8 que expresan CD103 y TCF7 en el control tumoral, ya que mayor abundancia se relacionó con los pacientes que tras dos años de seguimiento se encontraban libres de la enfermedad. De forma importante se observó que es la población que expresa los tres marcadores la que es relevante en los pacientes libres de enfermedad ya que cuando se observa a la población CD8+ CD103- TCF7+ esta no es diferente entre los grupos de estudio y lo mismo ocurre para los CD8+ CD103+ TCF7- siendo esta última población de predominio en los pacientes metastásicos iniciales. Lo anterior describe la importancia de que la población sea residente en el tejido y exprese el factor de transcripción que ha sido asociado a células tipo progenitoras. Es claro que en los pacientes libres de enfermedad se desarrolló una respuesta inmune suficiente para ofrecer protección, sin embargo, sigue siendo importante entender que sucede con los pacientes que no están controlando la enfermedad. Es probable que los pacientes que evolucionaron a metástasis hayan generado respuesta inmune frente al tumor, ya que tienen un mayor porcentaje de linfocitos CD8+CD103 TCF7+ que lo observado la piel control, sin embargo, esta respuesta probablemente no fue suficiente para la protección a largo plazo, lo cual recalca la importancia de seguir investigando los factores involucrados en el control tumoral. Las diferencias observadas entre pacientes podrían deberse a una mayor carga mutacional de los libres de enfermedad comparado a los metastásicos, sin embargo, recientemente se ha reportado que la carga mutacional no representa una diferencia ni en la supervivencia ni en la cantidad de linfocitos CD8 que infiltran el melanoma⁴². Por ello sería relevante evaluar que otros mecanismos pueden estar involucrados en las diferencias que existen en los infiltrados.

Algunas evidencias señalan que los linfocitos Trm no muestran firmas que correspondan al fenómeno de agotamiento⁶¹, pero nuestros hallazgos sugieren que si pueden existir poblaciones con características agotadas y de residencia de tejido. Se logró observar que los CD8 CD103 TCF7 expresan marcadores tanto de residencia de tejido (Hobit, Runx3, CD69) así como marcadores de agotamiento (PD-1, TOX). Esto se podría asociar al fenotipo que se ha denominado "tipo progenitor agotado" el cual se sugiere es una etapa temprana del agotamiento

donde el linfocito aún prolifera y responde frente al tumor ⁴³, además de que esta población es residente de tejido en el caso del melanoma. Además, se encontró que esta población puede coexpresar TCF7, PD1 y CD45RO reforzando la idea de que esta población puede ser un tipo progenitor agotado o un linfocito “pre-agotado” y no una célula precursora de memoria ⁵⁶.

En los resultados obtenidos se observó una mayor abundancia en el porcentaje de la población TCF-7+ en los pacientes libres de enfermedad: esto toma relevancia debido a que estas células podrían estar manteniendo un nicho de células que se renueven y generen una respuesta más eficiente. Este hallazgo también podría ser relevante en el caso de tratamiento, como lo es la inmunoterapia ya que la presencia de nichos podría promover la formación de poblaciones funcionales que respondan frente a la inmunoterapia. Esto resulta coherente con reportes que asocian a dicha población con un mayor porcentaje de respuesta a inmunoterapia en melanoma, posicionando a esta población como favorable en la respuesta anti-tumoral ^{38,39}. De manera interesante se ha reportado que el factor de transcripción TCF-7 reduce sus niveles cuando un Trm se diferencia, debido a que este factor inhibe que CD103 se exprese ⁶²; estos hallazgos darían soporte la idea de que los Trm TCF-7+ son una población con características progenitoras que pueden estar manteniendo el nicho de Trm y por tanto el control de la enfermedad.

Al tratar de evidenciar la relevancia a la población CD8 observada con variables clínicas se observó que existe cierta relación con el índice de Breslow. Este índice suele ser uno de los primeros parámetros en medirse tras el diagnóstico, reportando en milímetros que tanto ha invadido el melanoma la piel de forma vertical ¹⁷ tratando de evaluar que tan avanzado esta la enfermedad así como ofrecer de cierto modo pronóstico. En este estudio se observó que a mayor abundancia de linfocitos CD8 CD103 TCF7 menor índice de Breslow, sin embargo, esta relación no es tan fuerte, sugiriendo en primera instancia que a pesar de que éste índice es útil en la clínica no es suficiente para distinguir a un paciente que resulta libre de enfermedad del que presenta metástasis de forma inicial, destacando la importancia de poder

esclarecer cuales son las variables tanto clínicas como inmunológicas para entender por qué algunos pacientes controlan la enfermedad y otros no.

Las células dendríticas clásicas tipo 1 son una de las poblaciones que por sus características y capacidad presentadora de antígeno puede influenciar de manera directa el fenotipo y abundancia de linfocitos CD8 ⁴². En este trabajo se observó que la abundancia de esta población es mayor en pacientes libres de enfermedad comparado a pacientes de evolución a metástasis o metastásicos iniciales. Este hallazgo podría deberse a que en algunos pacientes estas células podrían estar siendo activadas de forma más eficiente, tal vez por mecanismos de quimio atracción o presencia más abundante de señales de daño, resta por evaluar específicamente promueve que esta población sea abundante o no. Uno de los hallazgos que resaltó es el alto porcentaje de cDC1 PD-L1 y CD40 positivas en las células dendríticas de los pacientes que no evolucionaron a metástasis, además de la evidencia que señala que una cDC1 puede estar coexpresando ambos marcadores. Se ha reportado en el infiltrado tumoral de cáncer pulmonar en modelos murinos la presencia de una población llamada mregDC (DCs maduras enriquecidas en moléculas inmunoreguladoras). Dicha población se caracteriza por expresar genes asociados a moléculas coactivadoras como CD40, CD80 y CD86, moléculas coinhibitorias como PD-L1, además de genes asociados a perfil Th2 como lo es IL-4Ra e IL-4I1. En este mismo estudio se encontró una firma en humanos correspondiente a mregDCs la cual se distinguía de las otras poblaciones por la expresión de IL-12 ⁶³. En este estudio se observó a nivel de proteína que sí existen poblaciones DC que pueden estar coexpresando una amplia variedad de moléculas coestimuladoras positivas y negativas y que es el balance de estas moléculas lo que puede estar determinando la función de la población. Por ejemplo, se observó que la expresión de CD40 en las cDC1 doble positivas es mayor comparado a la misma población en los pacientes metastásicos iniciales, donde el perfil parece estar más declinado a un papel de tolerancia o regulación por la expresión de IDO.

Uno de los resultados que más llamo nuestra atención es la gran abundancia de células CD40 negativo PD-L1 positivo en los pacientes libres de enfermedad, ya que se suele tener la concepción de que PD-L1 únicamente puede representar inhibición de la respuesta inmune. A pesar de ello, existen estudios que indican que un motivo intracitoplasmático de la molécula PD-L1 tiene que ver con la migración de las DCs al ganglio linfático ⁶⁴. Además, se sabe que la expresión de esta molécula puede ocurrir en etapas tempranas de la activación de una DC, sugiriendo que la población observada es de reciente activación incluso antes de migrar al ganglio linfático. Adicionalmente se observó que la mayoría de las células perteneciente a esta subpoblación de cDC1 tienen un perfil activador IL12+ CD86+ IDO-, lo cual podría explicar la gran abundancia de esta población en los pacientes libres de enfermedad.

Finalmente, se encontró que los CD8 CD103 TCF7 y cDC1 están relacionados en abundancia, sugiriendo en principio, que las cDC1 podrían estar promoviendo y sosteniendo la presencia de los linfocitos CD8 CD103 TCF7 en pacientes libres de enfermedad, contrario a metastásicas iniciales donde poca abundancia de cDC1 también tiene que ver con poca abundancia de la población CD8. Se observó que los linfocitos CD8 CD103 TCF7 se encuentran formando agrupaciones cercanas al tumor en pacientes libres de enfermedad, comparada a los metastásicos iniciales, sugiriendo que esta organización puede ser relevante para el control de la enfermedad. Este resultado podría tener sentido ya que se ha observado que la presencia de estructura linfoides en los tejidos puede ser de importancia con la respuesta a inmunoterapia en melanoma ⁶⁵, restaría por evaluar si las agrupaciones observadas podrían corresponder a estructuras linfoides y profundizar en la relación de esto con el desenlace clínico de los pacientes. Además, se observó en pacientes libres de enfermedad las cDC1 y CD8 CD103 TCF7 se encuentran en estrecho contacto entre ellas, así como zonas cercanas al tumor, definiéndose áreas específicas de tumor, interacción tumor-T-DC y áreas T-DC que probablemente se encuentran realizando inmunovigilancia, evitando que la célula tumoral escape, controlando la enfermedad.

X. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que el infiltrado inmune de CD8 y cDC1 es similar entre melanoma acral y cutáneo. Se observó que los linfocitos CD8 CD103 TCF7 están asociados al control de la enfermedad, ya que mayor abundancia de esta población está relacionada con la no evolución a metástasis, así como a una menor invasividad en la piel. La evidencia apunta que las cDC1 también están relacionadas al control tumoral, ya que un mayor porcentaje de éstas aparece en los pacientes libres de enfermedad. Se encontró que en los pacientes libres de enfermedad las cDC1 tienen fenotipo predominantemente activador y en los metastásicas iniciales regulador. Finalmente se encontró que las poblaciones evaluadas parecen estar relacionadas entre ellas tanto en abundancia, así como su ubicación en el tejido, definiéndose en zonas organizadas y de interacción cerca del tumor en los pacientes libres de enfermedad. Todos estos datos en conjunto permiten evidenciar que los linfocitos CD8 CD103 TCF7 y las cDC1 están relacionados al control del melanoma en pacientes mexicanos.

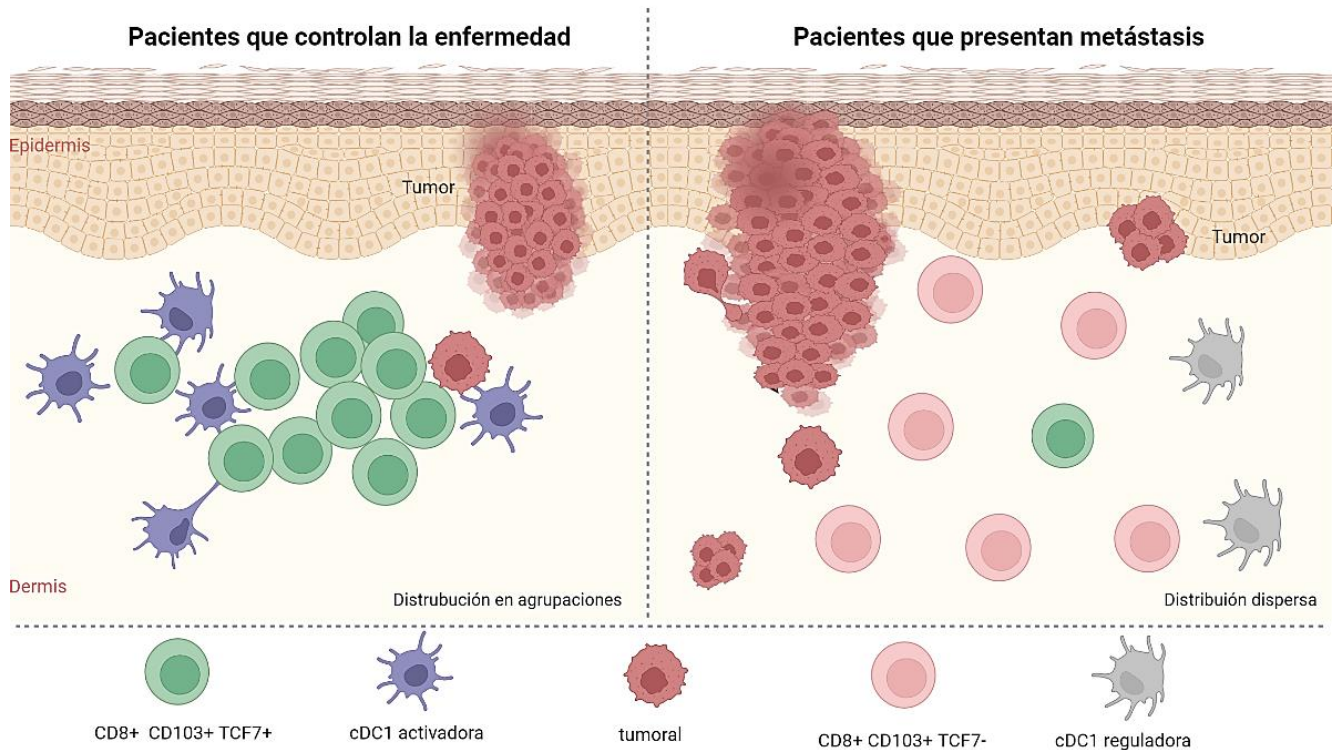


Figura 21. Linfocitos CD8 CD103 TCF7 y cDC1 y su papel en el control del melanoma

A Modelo que describe que en los pacientes que controlan la enfermedad existe abundancia de linfocitos CD8 CD103 TCF7 y cDC1 con fenotipo activador, además de que en estos pacientes estas dos poblaciones se localizan cerca del tumor formando agrupaciones. Por otro lado, en los pacientes que presentan metástasis los linfocitos CD8 presentan un fenotipo TCF7 negativo, se encuentran no organizados y tienen poca abundancia de cDC1 que en su mayoría son inmunoreguladoras.

XI. PERSPECTIVAS

1. Evaluar la capacidad citotóxica de los linfocitos CD8 CD103 TCF7 y cuál es su papel funcional directo en el control de la enfermedad de melanoma acral y cutáneo

2. Profundizar en el perfil de la población CD8 residente de tejido con características progenitoras, describiendo expresión de moléculas efectoras, marcadores de agotamiento y residencia de tejido en pacientes que controlan o no la enfermedad de melanoma acral y cutáneos, así como respondedores y no respondedores a inmunoterapia.

3. Determinar si los linfocitos CD8 residentes de tejido con características progenitoras pueden responder a la inmunoterapia de punto de control, así como su función en el control del melanoma.

4. Evaluar la importancia del contexto tumoral en la diferenciación del linfocito CD8 al fenotipo residente de tejido con características progenitoras.

5. Caracterizar el fenotipo de las cDC1 presentes en el tumor como una de las principales células que da soporte a la población CD8 de interés, evaluando la expresión de moléculas efectoras o inhibitoras y su relación con el control de la enfermedad y la respuesta a inmunoterapia.

6. Evaluar la composición y organización de nichos inmunológicos presentes en el tumor, determinando su relación en el soporte o mantenimiento de la población CD8 residente de tejido con características progenitoras.

7. A partir de todas las poblaciones inmunes evaluadas en el microambiente tumoral seleccionar aquellas relevantes para generar un score/ punto de corte útil para ofrecer pronóstico y diferenciar pacientes respondedores o no a la inmunoterapia.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2017. *Genes Dev.* **21**, 2525–2538 (2017).
2. Aco Flores, Yasmín; Herrera González, N. E. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=47316054010>. *Rev. Espec. Médico-Quirúrgicas* **15**, 161–164 (2010).
3. Carr, S., Smith, C. & Wernberg, J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. *Surg. Clin. North Am.* **100**, 1–12 (2020).
4. Roldan, R. Aumenta el número de casos de melanoma en México. Boletín UNAM-DGCS-469 https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2019_469.html (2019).
5. Hernández-Domínguez DA, Aldaco-Sarvide F, Cervantes-Sánchez G, Erazo-Valle-Solís AA, Pérez-Pérez P, Torrecillas-Torres L, Cortés-Esteban P, Juárez-Ramiro A, D. A. La mortalidad por melanoma en México aumenta. 123–129 (2019).
6. WHO. Crude and Age-Standardised Rates per 100,000. <https://www-dep.iarc.fr/WHODb/table3.asp> (2000).
7. The Global Cancer Observatory. Globocan 2020: México. *Int. Agency Res. Cancer* **929**, 29–30 (2020).
8. Lino-Silva, L. S., Zepeda-Najar, C., Salcedo-Hernández, R. A. & Martínez-Said, H. Acral Lentiginous Melanoma: Survival Analysis of 715 Cases. *J. Cutan. Med. Surg.* **23**, 38–43 (2019).
9. Schadendorf, D. *et al.* Melanoma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, 1–20 (2015).
10. Ortega, B. C., Garay, U. Á. & Gómez, G. Claves dermatoscópicas del melanoma acral lentiginoso. *Dermatología Rev. Mex.* **56**, 180–186 (2012).
11. Basurto-Lozada, P. *et al.* Acral lentiginous melanoma: Basic facts, biological characteristics and research perspectives of an understudied disease. *Pigment Cell Melanoma Res.* **34**, 59–71 (2021).
12. Huang, K., Fan, J. & Misra, S. Acral Lentiginous Melanoma: Incidence and Survival in the United States, 2006-2015, an Analysis of SEER Registry. *J. Surg. Res.* **251**, 329–339 (2020).
13. Rabbie, R., Ferguson, P., Molina-Aguilar, C., Adams, D. J. & Robles-Espinoza, C. D. Melanoma subtypes: genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities. *J. Pathol.* **247**, 539–551 (2019).
14. Hayward, N. K. *et al.* Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature* **545**, 175–180 (2017).
15. Al-Hassani, F., Chang, C. & Peach, H. Acral lentiginous melanoma – Is inflammation the missing link? *JPRAS Open* **14**, 49–54 (2017).
16. Costello, C. M., Pittelkow, M. R. & Mangold, A. R. Acral Melanoma and Mechanical Stress on the Plantar Surface of the Foot. *N. Engl. J. Med.* **377**, 395–396 (2017).
17. Chopra, A., Sharma, R. & Rao, U. N. M. Pathology of Melanoma. *Surg. Clin. North Am.* **100**, 43–59 (2020).
18. Elder, D. E., Bastian, B. C., Cree, I. A., Massi, D. & Scolyer, R. A. The 2018 World Health Organization classification of cutaneous, mucosal, and uveal melanoma detailed analysis of

- 9 distinct subtypes defined by their evolutionary pathway. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **144**, 500–522 (2020).
19. Rigel, D. S., Friedman, R. J., Kopf, A. W. & Polsky, D. ABCDE--an evolving concept in the early detection of melanoma. *Archives of dermatology* vol. 141 1032–1034 (2005).
 20. Melanoma Skin Cancer Stages. *American Cancer Society* www.cancer.org (2021).
 21. Hartman, R. I. & Lin, J. Y. Cutaneous Melanoma—A Review in Detection, Staging, and Management. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **33**, 25–38 (2019).
 22. Zepeda-Najar, C. *et al.* The influence of body mass index on the survival of patients with melanoma. A cross-sectional study of 707 patients. *Wspolczesna Onkol.* **25**, 23–27 (2021).
 23. Gallegos Hernández, J. F., Gallegos Hernández, J. F. & Nieweg, O. E. Melanoma cutáneo (Mc): Diagnóstico y tratamiento actuales. *Gac. Med. Mex.* **150**, 175–182 (2014).
 24. 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).
 25. Passarelli, A., Mannavola, F., Stucci, L. S., Tucci, M. & Silvestris, F. Immune system and melanoma biology: A balance between immunosurveillance and immune escape. *Oncotarget* **8**, 106132–106142 (2017).
 26. Palucka, A. K. & Coussens, L. M. Review The Basis of Oncoimmunology. *Cell* **164**, 1233–1247 (2016).
 27. Topalian, S. L., Drake, C. G. & Pardoll, D. M. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* **27**, 450–461 (2015).
 28. Amsen, D., Van Gisbergen, K. P. J. M., Hombrink, P. & Van Lier, R. A. W. Tissue-resident memory T cells at the center of immunity to solid tumors. *Nat. Immunol.* **19**, 538–546 (2018).
 29. Park, S. L., Gebhardt, T. & Mackay, L. K. Tissue-Resident Memory T Cells in Cancer Immun-surveillance. *Trends Immunol.* **40**, 735–747 (2019).
 30. 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**, (2020).
 31. Gálvez-Cancino, F. *et al.* Vaccination-induced skin-resident memory CD8+ T cells mediate strong protection against cutaneous melanoma. *Oncoimmunology* **7**, 1–12 (2018).
 32. Steinbach, K., Vincenti, I. & Merkler, D. Resident-Memory T Cells in Tissue-Restricted Immune Responses : For Better or Worse ? **9**, 1–15 (2018).
 33. Mackay, L. K. *et al.* The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat. Immunol.* **14**, 1294–1301 (2013).
 34. Schenkel, J. M., Fraser, K. A., Vezys, V. & Masopust, D. Sensing and alarm function of resident memory CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* **14**, 509–513 (2013).
 35. Ariotti, S. *et al.* T cell memory. Skin-resident memory CD8+ T cells trigger a state of tissue-wide pathogen alert. *Science* **346**, 101–105 (2014).
 36. MacKay, L. K. *et al.* The developmental pathway for CD103+ CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat. Immunol.* **14**, 1294–1301 (2013).

37. 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).
38. Sade-feldman, M. *et al.* Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma Article Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma. 998–1013 (2018) doi:10.1016/j.cell.2018.10.038.
39. Held, W., Siddiqui, I., Schaeuble, K. & Speiser, D. E. Intratumoral CD8+ T cells with stem cell-like properties: Implications for cancer immunotherapy. *Sci. Transl. Med.* **11**, 1–4 (2019).
40. Pulendran, B. The varieties of immunological experience: Of pathogens, stress, and dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 563–606 (2015).
41. Jansen, C. S. *et al.* An intra-tumoral niche maintains and differentiates stem-like CD8 T cells. *Nature* **576**, 465–470 (2019).
42. Lee, Y. S. & Radford, K. J. *The role of dendritic cells in cancer. International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 348 (Elsevier Inc., 2019).
43. Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I. & Trombetta, E. S. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science (80-.)*. **307**, 1630–1634 (2005).
44. Ruhland, M. K. *et al.* Visualizing Synaptic Transfer of Tumor Antigens among Dendritic Cells. *Cancer Cell* **37**, 786-799.e5 (2020).
45. Iborra, S. *et al.* Optimal Generation of Tissue-Resident but Not Circulating Memory T Cells during Viral Infection Requires Crosspriming by DNGR-1+ Dendritic Cells. *Immunity* **45**, 847–860 (2016).
46. Fuertes, M. B. *et al.* Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8 α + dendritic cells. *J. Exp. Med.* **208**, 2005–2016 (2011).
47. Salmon, H. *et al.* Expansion and Activation of CD103+ Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity* **44**, 924–938 (2016).
48. Lee, Y. S. *et al.* Human CD141 + dendritic cells (cDC1) are impaired in patients with advanced melanoma but can be targeted to enhance anti-PD-1 in a humanized mouse model. *J. Immunother. Cancer* **9**, 1–12 (2021).
49. Lin, J. R. *et al.* Highly multiplexed immunofluorescence imaging of human tissues and tumors using t-CyCIF and conventional optical microscopes. *Elife* **7**, 1–46 (2018).
50. Komura, D. & Ishikawa, S. Machine Learning Methods for Histopathological Image Analysis. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **16**, 34–42 (2018).
51. Choi, R. Y., Coyner, A. S., Kalpathy-cramer, J., Chiang, M. F. & Campbell, J. P. Introduction to Machine Learning , Neural Networks , and Deep Learning. 1–12 (2020).
52. Piccialli, F., Somma, V. Di, Giampaolo, F., Cuomo, S. & Fortino, G. A survey on deep learning in medicine: Why, how and when? *Inf. Fusion* **66**, 111–137 (2021).
53. Brinker, T. J. *et al.* Deep learning outperformed 136 of 157 dermatologists in a head-to-head dermoscopic melanoma image classification task. *Eur. J. Cancer* **113**, 47–54 (2019).
54. Rank, N. *et al.* Deep-learning-based real-time prediction of acute kidney injury outperforms

- human predictive performance. *npj Digit. Med.* **3**, 139 (2020).
55. Newell, F. *et al.* Whole-genome sequencing of acral melanoma reveals genomic complexity and diversity. *Nat. Commun.* **11**, 1–14 (2020).
 56. Ando, M., Ito, M., Srirat, T., Kondo, T. & Yoshimura, A. Memory T cell, exhaustion, and tumor immunity. *Immunol. Med.* **43**, 1–9 (2020).
 57. Tumeah, P. C. *et al.* adaptive immune resistance. (2014) doi:10.1038/nature13954.
 58. Han, J., Khatwani, N., Searles, T. G., Turk, M. J. & Angeles, C. V. Memory CD8+ T cell responses to cancer. *Semin. Immunol.* **49**, 101435 (2020).
 59. Edwards, J. *et al.* CD103+ tumor-resident CD8+ T cells are associated with improved survival in immunotherapy-naïve melanoma patients and expand significantly during anti-PD-1 treatment. *Clin. Cancer Res.* **24**, 3036–3045 (2018).
 60. Sade-Feldman, M. *et al.* Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma. *Cell* **175**, 998-1013.e20 (2018).
 61. Clarke, J. *et al.* Single-cell transcriptomic analysis of tissue-resident memory T cells in human lung cancer. *J. Exp. Med.* **216**, 2128–2149 (2019).
 62. Wu, J. *et al.* T Cell Factor 1 Suppresses CD103+ Lung Tissue-Resident Memory T Cell Development. *Cell Rep.* **31**, 107484 (2020).
 63. Maier, B. *et al.* A conserved dendritic-cell regulatory program limits antitumour immunity. *Nature* **580**, 257–262 (2020).
 64. Lucas, E. D. *et al.* Article PD-L1 Reverse Signaling in Dermal Dendritic Cells Promotes Dendritic Cell Migration Required for Skin Immunity II II PD-L1 Reverse Signaling in Dermal Dendritic Cells Promotes Dendritic Cell Migration Required for Skin Immunity. (2020) doi:10.1016/j.celrep.2020.108258.
 65. Mitra, S. *et al.* Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. (2019) doi:10.1038/s41586-019-1914-8.