



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado



Facultad de Farmacia

# **Generación de linfocitos T CD8 con un fenotipo de memoria residente para protocolos de inmunoterapia adoptiva antitumoral**

Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica Clínica e Inmunología

EDUARDO FELIPE DURÁN JARA

CONCEPCIÓN-CHILE

2016

Profesor Guía: Álvaro Lladser, PhD  
Laboratorio de Inmunoterapia Génica  
Fundación Ciencia y Vida

## AGRADECIMIENTOS

Un largo camino después de uno más largo aún, terminado con éxito. Claramente nada hubiera sido posible sin el apoyo incondicional y confianza que me brinda mi familia. Patricia Jara Jorquera, Luis Durán Montecinos y Carlos Durán Jara, los amo y respeto.

Amigos míos, principalmente Pamela Navarro Figueroa, también su apoyo y mensajes de “dale con todo” fueron el ánimo que necesité para seguir adelante en momentos difíciles.

Compañeros y amigos de ITG, siempre apoyándome desde mi primer día. Risas por montón para amenizar el trabajo, conversaciones profundas...otras, no tanto. Mención especial para Paola, Nicole y Ernesto, grandes personas y personajes.

A mi tutor, Dr. Alvaro Lladser, por todo su conocimiento y paciencia.

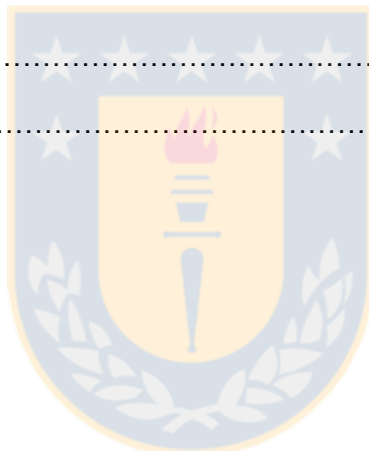
Por último, Karla Durán Velázquez, ahora eres parte importante de mi vida, y sin tu constante apoyo y optimismo hubiera sido muy difícil concretar este paso.

Muchas gracias a todos

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Índice de figuras</b> .....	v
<b>Resumen</b> .....	vi
<b>Abstract</b> .....	vii
<b>Introducción</b> .....	1
Cáncer.....	1
Inmunoterapia antitumoral.....	2
Transferencia adoptiva de linfocitos T.....	4
Linfocitos T de memoria.....	7
Linfocitos T de memoria residente de tejidos.....	9
<b>Hipótesis</b> .....	14
<b>Objetivo</b> .....	14
<b>Objetivos Específicos</b> .....	14
<b>Materiales</b> .....	15
<i>Medios de cultivo y soluciones</i> .....	15
<i>Anticuerpos y citoquinas</i> .....	15
<i>Líneas celulares</i> .....	16
<b>Métodos</b> .....	16
<i>Cultivo, congelación y descongelación de células adherentes</i> .....	16
<i>Generación de partículas retrovirales codificantes de CAR</i> .....	17
<i>Purificación y activación de linfocitos T CD8 murinos</i> .....	20
<i>Transducción de linfocitos T CD8 con partículas retrovirales codificantes de CAR</i> .....	20
<i>Inducción in vitro de fenotipo Trm en linfocitos T CD8 murinos</i> .....	21

<i>Estimulación in vitro de linfocitos T-CAR y CAR Trm con proteína CEA.....</i>	<i>22</i>
<i>Ensayo de citotoxicidad in vitro de células tumorales mediada por linfocitos CD8 Trm específicos.....</i>	<i>23</i>
<i>Tinción de células para citometría de flujo.....</i>	<i>24</i>
<i>Evaluación de la capacidad antitumoral de linfocitos T CD8 Trm específicos.....</i>	<i>25</i>
<i>Análisis estadístico.....</i>	<i>27</i>
<i>Manejo de animales de laboratorio.....</i>	<i>27</i>
<b>Resultados.....</b>	<b>28</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>45</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>55</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Estandarización de la concentración de TGF- $\beta$ para el cultivo de linfocitos T CD8 e inducción de un fenotipo Trm.....	31-32
Fig. 2. Estandarización del tiempo de incubación de linfocitos T CD8 con TGF- $\beta$ para la inducción de un fenotipo Trm.....	33
Fig. 3. Efecto de diferentes citoquinas en la expresión de CXCR3 en linfocitos T CD8.....	34
Fig. 4. Inducción de la expresión de marcadores Trm en linfocitos T CD8 modulada por distintas combinaciones de citoquinas.....	35
Fig. 5. Activación específica de linfocitos T CD8 con fenotipo Trm generados <i>in vitro</i> .....	38-40
Fig. 6. Citotoxicidad específica mediada por linfocitos T CD8 con fenotipo Trm generados <i>in vitro</i> .....	41
Fig. 7. Reducción tumoral mediada por linfocitos T CD8 con fenotipo Trm generados <i>in vitro</i> .....	43-44

## RESUMEN

El cáncer está entre las principales causas de muerte por enfermedades a nivel global. Las terapias convencionales no son eficaces en estados avanzados de la enfermedad y conllevan numerosos efectos secundarios, lo que ha promovido la búsqueda de nuevas terapias. La inmunoterapia ha emergido como una alternativa promisoriosa en el desarrollo de nuevas terapias antitumorales. La transferencia adoptiva de linfocitos T CD8, modificados con receptores quiméricos de antígeno (CAR) ha sido usada exitosamente como inmunoterapia contra cánceres hematológicos, sin embargo, ha mostrado baja eficacia contra tumores sólidos, principalmente debido a la baja capacidad de los linfocitos T-CAR para infiltrar y persistir en tumores. Por otro lado, los recientemente descritos linfocitos T CD8 de memoria residente (Trm) de tejidos se establecen permanentemente en tejidos no linfoides, otorgando una respuesta inmune adquirida rápida y potente ante la presencia de su antígeno, y estimulando indirectamente una respuesta inmune innata. Los Trm poseen una capacidad efectora superior a otros subtipos de memoria y su infiltración en tumores sólidos se asocia a mejor pronóstico en distintos tipos de cáncer. En consecuencia, resulta interesante generar linfocitos T-CAR diferenciados a Trm con el fin de mejorar su capacidad antitumoral *in vivo*. En este trabajo, se estableció un protocolo de transducción retroviral de linfocitos T CD8 con un CAR antitumoral y su inducción a un fenotipo Trm usando TGF- $\beta$  y otras citoquinas. La adquisición del fenotipo Trm se evaluó por la expresión de CD103, CD69 y CXCR3. Los linfocitos T-CAR Trm generados *in vitro* mostraron actividad efectora (producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) y citotóxica específica frente a CEA y células tumorales, similar a la actividad de linfocitos T CD8 diferenciados en condiciones efectoras clásicas (+ IL-2 e IL-15). Sin embargo, en los ensayos *in vivo*,

la transferencia de estos linfocitos T-CAR Trm no logró reducir el tamaño tumoral ni aumentar la sobrevivencia de los ratones tratados. Esta tesis sirve como primer paso para optimizar el tratamiento con linfocitos T-CAR y generar nuevas estrategias de inmunoterapia frente a tumores sólidos.

## ABSTRACT

The severity of side effects caused by conventional therapies, combined with the low efficacy in patients with advanced disease has prompted the search for new therapies. Immunotherapy has emerged as one of the most promising cancer therapies. In particular, adoptive transfer of genetically modified CD8 T cells with chimeric antigen receptors (CAR), has been successfully used as immunotherapy against hematological cancers, however, it has shown low efficacy in the treatment of solid tumors, mainly due to their low capacity to infiltrate tumors and to persist *in vivo*. On the other hand, tissue resident memory T cells (Trm) reside in non-lymphoid tissues for long periods, conferring a fast and potent response against their cognate antigen. Trm has superior effector capacity than other memory subtypes like Tem, and their infiltration of solid tumors has been associated with better prognosis and survival in patients with different types of cancer. As a consequence, the generation of CAR-T cells with a Trm phenotype in order to improve their *in vivo* antitumor capacity is an interesting strategy. In this thesis, it was established a retroviral transduction protocol of CD8 T cells with an antitumor CAR, followed by the induction of a Trm phenotype using TGF- $\beta$  and others cytokines. The acquisition of the Trm phenotype was evaluated through the expression of CD69, CD103 and CXCR3. Specific CD8 Trm cells generated *in vitro* has effector (production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) and cytotoxic capacity against its cognate antigen and tumor cells,

respectively, similar to the activity of CD8 T cells classically differentiated (+ IL-2 e IL-15). However, *in vivo* assays showed neither reduction in tumor growth nor improvement in the survival of treated mice. The present thesis serves as a first step to optimize the CD8 CAR-T cell treatment and the generation of new strategies of immunotherapy against solid tumors and other diseases.





## INTRODUCCIÓN

### Cáncer

El cáncer representa un problema de alta prioridad para la salud pública y la economía mundial. En el año 2012 se registraron alrededor de 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes asociadas a esta enfermedad en todo el mundo [1;2]. Se estima que a nivel mundial las muertes por cáncer aumenten desde 7,1 millones registradas en el 2002 hasta 11,5 millones para el 2030 [3]. A nivel nacional, el cáncer es la segunda causa de muerte, detrás de las enfermedades cardiovasculares. Por sí solo, produjo 137,2 muertes por cada 100.000 habitantes el 2011 [4]. El cáncer genera mayores costos que cualquier otra causa de muerte en el mundo, cifra que alcanzó cerca de un trillón de dólares durante el 2008 [5] y es responsable de la pérdida del 7,6% de los AVISA (Años de Vida Saludable) para enfermedades no transmisibles [6].

Mundialmente, los cánceres del aparato digestivo (CADs), que incluyen al cáncer gástrico, colorrectal, de vesícula biliar, entre otros, están dentro de los más comunes para ambos sexos [1]. El cáncer colorrectal constituye el cuarto tipo de cáncer más prevalente a nivel mundial, representando cerca del 17% de todas las muertes por tumores. Los tratamientos actuales contra los CADs (quimioterapia y radioterapia) no son del todo efectivos [7] y los efectos adversos asociados afectan significativamente la calidad de vida de los pacientes [8]. Asimismo, la detección de la mayoría de los cánceres se realiza de manera tardía, cuando éste se ha diseminado por el organismo y la extirpación del tumor primario no es suficiente para evitar la aparición de nuevos focos neoplásicos. En este contexto, la cirugía es

el tratamiento más efectivo utilizado contra los CADs; sin embargo, la tasa de supervivencia a 5 años post-cirugía apenas alcanza el 20-25% cuando se aplica de manera independiente y el 30-35% cuando se combina con quimio o radioterapia [7,9,10]. Por estos motivos, cobra vital importancia la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos con el fin de evitar efectos tóxicos, mejorar la calidad de vida de los pacientes, disminuir las tasas de recidiva y aumentar las de supervivencia.

### **Inmunoterapia antitumoral**

El sistema inmune es capaz de detectar y eliminar las células malignas que se generan constantemente en nuestro organismo en un proceso denominado inmunovigilancia [11]. Este proceso es iniciado por células presentadoras de antígeno, fundamentalmente células dendríticas, las cuales son capaces de captar y procesar antígenos tumorales, presentar péptidos derivados de estos a linfocitos T CD8 y/o CD4 mediante moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*) y activarlos para que eliminen las células que expresen dicho antígeno [12]. Los linfocitos T CD8 citotóxicos activados son capaces de reconocer antígenos expresados por células tumorales a través de su TCR (del inglés, *T cell receptor*) y destruirlas [13]. Sólo aquellos linfocitos T CD8 que poseen un TCR específico para una particular combinación MHC/péptido pueden activarse y recibir las señales coestimuladoras para proliferar y adquirir su fenotipo efector citotóxico. Al ser activados, los linfocitos T CD8 proliferan masivamente, en un proceso llamado “expansión clonal” [14]. Como consecuencia, se genera un “ejército” de linfocitos T que poseen la capacidad de reconocer las células que expresen el antígeno tumoral para luego eliminarlas. La lisis de las células tumorales se logra a través de la secreción de moléculas citotóxicas como

perforina, granzima, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  [15]. La respuesta inmune, mediada por linfocitos T efectores CD8 y CD4 es vital para inhibir la progresión del cáncer y su diseminación a otros órganos. Es más, la infiltración del tumor por linfocitos T CD8 (TILs, del inglés *tumor infiltrating lymphocytes*) se ha asociado a un buen pronóstico y a una mayor supervivencia en pacientes con distintos tipos de cáncer [16-18].

La baja eficacia de los tratamientos convencionales, los costos elevados, la alta mortalidad y los severos efectos secundarios asociados hacen muy necesaria la búsqueda de nuevas terapias para pacientes que sufren de cáncer [19]. La inmunoterapia antitumoral se basa en la capacidad del sistema inmune de reconocer células malignas y eliminarlas, y ha emergido como una nueva generación de tratamientos, capaz de generar una protección de larga duración contra el cáncer sin los efectos secundarios de las terapias convencionales. La inmunoterapia ha logrado una eficacia nunca antes vista en estados avanzados de distintos tipos de cáncer [20], siendo considerada el avance científico más destacado del 2013 por la revista *Science*. En particular, la transferencia adoptiva de linfocitos T CD8 ha demostrado un gran potencial en eliminar células tumorales, cuyos resultados se han visto tanto en modelos animales como en pacientes con distintos tipos de tumores [9,21,22]. En este contexto, la transferencia de linfocitos T autólogos antitumorales, en conjunto con el bloqueo de señales inhibitorias con anticuerpos monoclonales ha mostrado beneficios clínicos duraderos en pacientes con melanoma, cáncer de ovario, próstata y pulmón, los cuales no lograron responder a las terapias convencionales [23-27].

## **Transferencia adoptiva de linfocitos T**

El repertorio de linfocitos T consiste en cerca de  $10^{15}$  clones de linfocitos T CD8 vírgenes [28], cada uno expresando un TCR que les permite reconocer péptidos cortos presentados en moléculas de MHC-I [29]. Sin embargo, el sistema inmune está diseñado para no atacar células que presenten péptidos derivados de antígenos propios (autoantígenos), lo cual se logra, principalmente, mediante la eliminación de linfocitos T potencialmente autorreactivos durante la selección negativa que ocurre en el timo (tolerancia central). Este proceso resulta en que las inmunoterapias actuales contra el cáncer sólo puedan estimular linfocitos T que poseen TCR de baja o intermedia afinidad, los cuales, al ser específicos contra autoantígenos, no son capaces de eliminar eficientemente las células tumorales. Estudios recientes han reafirmado esta conclusión al demostrar que los linfocitos T que atacan al tumor espontáneamente están dirigidos principalmente contra neoepítomos resultantes de mutaciones somáticas en el genoma de las células tumorales, por lo que no fueron sujeto de la selección negativa [30-33]. Estos estudios han demostrado que aquellos pacientes que poseen TILs cuyos TCR reconocen neoepítomos con alta afinidad presentan una mejor respuesta clínica [34]. Es más, la administración de TILs autólogos, amplificados desde biopsias, ha demostrado su eficacia para eliminar tumores en pacientes con melanoma metastásico, neuroblastoma y otros tipos de cáncer [9,17,21]. La principal limitación de esta estrategia es la necesidad de obtener una biopsia del tamaño suficiente que permita la expansión eficiente de los TILs *ex vivo*, los cuales, normalmente están presentes en baja frecuencia. Esta limitación se ha logrado resolver mediante la modificación genética de linfocitos T con TCR antitumorales específicos, los cuales reconocen con alta afinidad un antígeno tumoral en particular. Esta estrategia

permite cambiar la especificidad de un linfocito T mediante la introducción estable en su genoma de los genes codificantes de las dos cadenas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) de un TCR antitumoral previamente caracterizado. Existen distintos sistemas de modificación genética de linfocitos T [35], siendo los gama-retrovirus los más utilizados al ser altamente eficientes para transformar linfocitos T [35]. Además, la modificación genética con estos vectores ha demostrado ser segura en distintos estudios [36-38]. Se ha comprobado tanto su seguridad como la permanencia de los linfocitos T modificados en el tiempo, pudiendo ser detectados incluso luego de 10 años, sin efectos adversos en los pacientes [39]. Se ha demostrado la eficacia y seguridad del uso de linfocitos T modificados con TCR en pacientes con melanoma metastásico [40,41]. Estudios más recientes también demuestran su eficacia en el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple [42]. Sin embargo, esta estrategia también tiene algunas limitaciones. La primera es que un TCR particular sólo puede ser usado en aquella fracción de pacientes que expresen la molécula de MHC reconocida por dicho TCR, reduciendo significativamente el número de pacientes que se puede beneficiar. Además, los tumores disminuyen la expresión de las moléculas de MHC como un mecanismo de evasión al reconocimiento inmune [43]. Por último, las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR introducido pueden asociarse con las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR endógeno, disminuyendo la densidad de TCR antitumorales en la superficie del linfocito T y generando TCR con especificidades desconocidas potencialmente riesgosas [44].

Una estrategia que supera las limitaciones de la modificación genética de linfocitos T con TCR, es la utilización de “receptores quiméricos de antígeno” (CAR, del inglés *chimeric antigen receptor*). Los CAR son receptores de cadena simple compuestos por una porción extracelular proveniente de un anticuerpo (scFv, del inglés *single*

*chain variable fragment*), seguido por una secuencia espaciadora, fusionada con los dominios citoplasmáticos de señalización provenientes de la molécula CD3 $\zeta$  y de alguna molécula coestimuladora (como CD28, OX40 y 4-1BB) [45]. Los CAR reconocen antígenos presentes en la superficie de las células tumorales sin la necesidad de ser presentados por las moléculas de MHC. Así, un CAR puede ser usado en cualquier paciente, independiente de las moléculas de MHC que éste exprese. Además, al estar formado por una cadena única, los CAR no compiten con los TCR endógenos. Una vez que el antígeno blanco es reconocido por el CAR, se inicia una cascada de señalización, tal como ocurriría a través de un TCR [46], lo que desencadena la activación del linfocito T-CAR, la secreción de citoquinas (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) y la liberación de mediadores citotóxicos como perforina y granzima, lo que culmina con la destrucción de la célula blanco. Por lo tanto, la administración de linfocitos T-CAR representa una estrategia tremendamente promisorio para el tratamiento de CADs. La administración de linfocitos T-CAR autólogos ha demostrado su eficacia en alrededor del 70-90% de los pacientes tratados con leucemia y ~50% de pacientes tratados con neuroblastoma, linfoma y melanoma [21,41,47-51]. Actualmente, el uso de linfocitos T-CAR está siendo probado en estudios clínicos de varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, de cuello y de próstata [52]. En un metanálisis de estudios clínicos fase I y II, se concluyó que menos del 2% de los pacientes con cáncer colorrectal metastásico tratados con una inmunoterapia mostraron algún grado de beneficio a nivel clínico (respuestas completas o parciales) [53,54]. En cuanto a inmunoterapias basadas en la administración de linfocitos T, los resultados clínicos son menores, sin embargo, a nivel preclínico en cáncer colorrectal, el uso de linfocitos T modificados genéticamente ha mostrado resultados promisorios [55]. Dado los antecedentes expuestos, surge la necesidad de buscar tratamientos eficaces y seguros para

pacientes con estos tipos de cáncer. Considerando las alternativas inmunoterapéuticas disponibles, la utilización de linfocitos T autólogos expresando un CAR específico para un antígeno tumoral de superficie presente en CADs representa una alternativa altamente promisorio. En este contexto, el antígeno carcinoembrionario (CEA, del inglés *carcinoembryonic antigen*) es altamente expresado en aproximadamente el 90% de los CADs [56,57], incluyendo la población de *cancer stem cells* [58,59], pero ausente o presente en muy bajos niveles en tejidos normales. El CEA ha sido clasificado como uno de los 15 antígenos tumorales más atractivos para ser usado en inmunoterapias [60], por lo que representa un atractivo blanco para redirigir los linfocitos T-CAR [61]. A nivel clínico se han transferido linfocitos T-CAR contra CEA en pacientes con cáncer colorrectal metastásico en hígado, en el cual todos los pacientes mostraron necrosis en las lesiones hepáticas y reducción en los niveles de CEA sanguíneo, sin efectos adversos, demostrando la seguridad y eficacia de la terapia [62]. Del mismo modo, existen varios reportes prometedores en cuanto a la utilización de linfocitos T-CAR en modelos animales y ensayos clínicos [48,52], sin embargo, su eficacia para eliminar tumores sólidos no ha podido ser reproducida [63], probablemente debido a la dificultad de los linfocitos T-CAR transferidos de infiltrar el tumor y persistir *in vivo* [64]. El uso de linfocitos T-CAR sigue considerándose como una estrategia revolucionaria en el campo de la inmunoterapia y por lo tanto se torna atractiva para el tratamiento de distintos cánceres, incluido los CADs.

### **Linfocitos T de memoria**

Con el fin de adquirir su capacidad efectora, los linfocitos T CD8 vírgenes necesitan ser activados por células dendríticas que presenten péptidos derivados de

antígenos, cargados en moléculas de MHC-I [65]. Sólo aquellos linfocitos T CD8 que, con su TCR, reconozcan el complejo péptido/MHC específico serán activados y proliferarán para producir linfocitos T CD8 efectores (Tef) con el mismo origen clonal [14]. Estos linfocitos T CD8 citotóxicos pueden sobrevivir por algunas semanas y sólo una pequeña fracción (~10%) de ellos persistirá como linfocitos T CD8 de memoria [66]. Basado en la capacidad de los linfocitos Tef CD8 de generar células de memoria, estos pueden ser clasificados dependiendo de la expresión de las moléculas de superficie CD127 y KLRG1, en células efectoras (CD127<sup>low</sup> KLRG1<sup>high</sup>) y células precursoras de memoria (CD127<sup>high</sup> KLRG1<sup>low</sup>) [67]. Es normalmente aceptado que los linfocitos T CD8 de memoria se dividen funcional y anatómicamente en dos categorías principales: Tem y Tcm [68]. Ambas subpoblaciones de memoria pueden ser distinguidas fenotípicamente basadas en la expresión de moléculas de destinación a órganos linfoides como CD62L y CCR7. Los Tcm expresan ambas moléculas y son capaces de recircular entre sangre y órganos linfoides secundarios como ganglios linfáticos y bazo; por el contrario, los Tem carecen de la expresión de CD62L y CCR7, pero expresan otras moléculas o receptores que median su llegada a otros tejidos, por lo que son capaces de recircular a través de la sangre hacia tejidos no linfoides [69].

En el contexto de la inmunoterapia antitumoral, se busca la generación de linfocitos T CD8 de memoria que persistan en el tiempo y otorguen protección a largo plazo, capaces de erradicar tumores establecidos y diseminados. Se ha visto que determinadas poblaciones de linfocitos T de memoria, específicos contra el tumor poseen una actividad antitumoral superior, incluso que linfocitos Tef de corta vida media [70]. Si consideramos al cáncer como una patología crónica, resulta interesante el desarrollo de una inmunoterapia antitumoral basada en la



transferencia de linfocitos T que se puedan diferenciar en linfocitos T de memoria por sobre un fenotipo efector.

### **Linfocitos T de memoria residente de tejidos**

En los últimos años, un nuevo subtipo de linfocitos T de memoria, denominado linfocitos T de memoria residente de tejidos (Trm) ha sido descrito. Estos linfocitos residen permanentemente en tejidos no linfoides como piel, pulmón, intestino, cerebro, tracto reproductor femenino, entre otros, y se caracterizan por no recircular por el torrente sanguíneo. Los Trm expresan en su superficie las moléculas CD69 y CD103, y luego de reconocer a su antígeno, se activan potente y rápidamente, produciendo altos niveles de moléculas efectoras, incluyendo IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y granzima B, así como quimioquinas y citoquinas inflamatorias generando un estado de alerta general, entregando protección contra agentes infecciosos que expresan dicho antígeno, así como contra patógenos no relacionados [71,72]. Notablemente, los Trm persisten por largos periodos, tienen una capacidad efectora superior y parecen estar en mayor abundancia que los Tem y Tcm [73].

Luego de una infección aguda, los linfocitos T CD8 específicos se expanden clonalmente en el respectivo ganglio linfático drenante, lugar donde se favorece la expresión de receptores y moléculas de destinación hacia tejidos específicos en su superficie [74]. Bajo condiciones inflamatorias, quimioquinas como CXCL9 y CXCL10 pueden ser producidas en el tejido, por ejemplo, la piel, atrayendo linfocitos Tef que expresan el receptor CXCR3 [75]. En la fase efectora de la respuesta inmune, los linfocitos T CD8 efectores con fenotipo de precursores de memoria (CD127<sup>high</sup> KLRG1<sup>low</sup>) migran al tejido inflamado, lugar donde, bajo señales

específicas para cada tejido adquieren un programa génico distintivo y pasan a residir permanentemente [76]. De manera interesante, los Trm de tejidos no relacionados entre sí adquieren un programa génico similar, diferente de Tem, Tcm y linfocitos T vírgenes [76,77]. La adquisición y mantención del fenotipo Trm ha mostrado depender tanto de la presencia del antígeno [78-80], como de factores derivados de cada tejido, tales como TGF- $\beta$ , IL-15, TNF- $\alpha$  e IL-33 [78]. De manera importante, el receptor de quimioquinas CXCR3, normalmente involucrado en la migración de células inmunes a tejidos inflamados, está involucrado en el establecimiento y desarrollo de los Trm en la piel, específicamente en el tránsito desde la dermis a la epidermis [76]. Además, se ha relacionado a este receptor con la extravasación de linfocitos T CD8 desde el torrente sanguíneo hacia el estroma del tumor [75,81] y con la generación eficiente de linfocitos T de memoria [82].

La característica principal de los Trm es la elevación en la expresión de las moléculas CD69 y CD103, sin embargo, además de esto, es necesaria una disminución recíproca de la expresión del factor de transcripción KLF2 y del receptor S1Pr1 [77,83]. Existen reportes que muestran que la exposición tanto *in vitro* como *in vivo* de linfocitos T a TGF- $\beta$  genera una subpoblación de linfocitos T CD103+ con una importante capacidad efectora y que además persisten en el tejido infectado por largos períodos [76,78]. En individuos sanos, CD103 se expresa en ~2% de los linfocitos circulantes, pero es ampliamente expresado en linfocitos T intraepiteliales de intestino y piel [84-86]. La molécula CD103 corresponde a la subunidad  $\alpha E$  del heterodímero integrina  $\alpha E\beta 7$ , cuyo ligando, E-cadherina, es expresado en altos niveles por células tumorales de origen epitelial. Se ha visto que la interacción entre CD103 expresado en TILs CD8 con E-cadherina presente en la superficie de células tumorales, es necesaria para el posicionamiento y exocitosis de los gránulos

citotóxicos de los linfocitos T CD8 cercanos a la interface entre ambos tipos celulares, lo que favorecería la muerte de las células tumorales blanco [87]. La unión de CD103 con E-cadherina no sólo promueve el reconocimiento antigénico favoreciendo la adhesión de los linfocitos T a su célula tumoral blanco [88], sino que también induce la coestimulación de linfocitos T CD8 citotóxicos, gatillando la activación de vías de señalización intracelulares que cooperan con las señales mediadas por el TCR [89]. Además, se ha demostrado que los Trm CD103+ son transcripcionalmente distintos de su contraparte CD103- [90]. Por otra parte, la sobreexpresión de CD69 también estaría involucrada en la residencia tisular de los Trm interactuando y degradando el receptor para la molécula S1P, S1Pr1, evitando que los linfocitos sean capaces de responder al gradiente de S1P, el cual es abundante en la sangre y linfa [91]. La expresión de S1Pr1 también es disminuida transcripcionalmente para el establecimiento de linfocitos Trm mediante la regulación transcripcional del factor KLF2 [83]. La residencia de linfocitos Trm se ve drásticamente alterada cuando estos carecen de CD69 y CD103, así como cuando sobreexpresan KLF2 o S1Pr1 [76,83]. Interesantemente, existen linfocitos Trm localizados en el sitio de infección que pueden carecer de CD103 [80]. De manera similar, se ha demostrado que distintos factores de transcripción, además de KLF2, participan en el desarrollo y formación de Trm. Dentro de estos, la expresión de los factores T-bet y Eomes necesita ser suprimida para favorecer la señalización mediada por TGF- $\beta$ , la citoquina más importante en la inducción de la expresión de CD103. Sin embargo, mientras que la expresión de Eomes necesita ser suprimida completamente, es necesaria una expresión residual de T-bet para mantener la expresión de superficie del receptor de IL-15, CD122, el cual media la proliferación homeostática y supervivencia de Trm en algunos tejidos como piel y pulmón [91]. De manera similar, recientemente se ha demostrado la importancia de la expresión de

los factores de transcripción Blimp1 y Hobit, siendo este último el factor crítico en el desarrollo y establecimiento de los Trm [92]. Anteriormente, se ha descrito que la inhibición de la expresión de T-bet es necesaria para un desarrollo óptimo y supervivencia de los Trm CD8 CD103+ en el pulmón [93], además, este factor de transcripción controla la expresión de moléculas como CD122 y CXCR3 [94].

Los Trm corresponden a una subpoblación de linfocitos T con una capacidad efectora superior a otras subpoblaciones de memoria que reside en tejidos no linfoides como intestino [95,96], piel [97,98], pulmón [99], entre otros. Se ha demostrado la participación de los Trm en la respuesta inmune frente a reinfecciones virales [78,100]. Además, existen reportes recientes que relacionan la presencia de TILs CD8 con fenotipo Trm con un buen factor pronóstico y una mayor supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón [99], ovario [84], vejiga [101] y endometrio [102]. Más aún, tumores que contenían TILs CD8 pero que no expresan CD103 se asociaron a menor supervivencia y peor pronóstico, similar a una condición carente completamente de TILs [84].

Considerando la necesidad de generar nuevas terapias antitumorales que aumenten las tasas de supervivencia, con mínimos efectos adversos y que mejoren la calidad de vida de los pacientes, resulta atractiva la idea de generar una inmunoterapia antitumoral basada en la generación de linfocitos T CD8 modificados genéticamente para expresar un CAR contra un antígeno tumoral, específicamente contra CEA expresado en altos niveles en CADs. Las ventajas que llevaría consigo la inducción de un fenotipo Trm CD103+CD69+ en linfocitos T-CAR antitumorales, capaces de infiltrar tumores y que residan por largos periodos en el tejido ejerciendo su actividad antitumoral, surge como una atractiva alternativa inmunoterapéutica. Por lo tanto, en

este trabajo, se pretende generar *in vitro* linfocitos T CD8 CAR+ anti-CEA con un fenotipo Trm CD103+CD69+ y evaluar tanto *in vitro* como *in vivo* su activación frente al antígeno CEA y su potencial antitumoral en protocolos de terapia adoptiva.



## HIPÓTESIS

La adquisición de un fenotipo Trm (CD103+CD69+) promueve la capacidad antitumoral de linfocitos T CD8 usados en terapias adoptivas en modelos murinos.

## OBJETIVO

Diseñar una estrategia para mejorar la capacidad antitumoral de los linfocitos T CD8 usados en protocolos de terapia adoptiva antitumoral.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar un método *in vitro* de generación de los linfocitos T CD8 transducidos con CAR con fenotipo Trm.
2. Evaluar *in vitro* la activación específica de los linfocitos T CD8 con un fenotipo Trm y compararlos con linfocitos T CD8 activados convencionalmente.
3. Evaluar la capacidad de los linfocitos T CD8 con un fenotipo Trm de reducir el tamaño de tumores sólidos en modelos murinos *in vivo*.

## MATERIALES

### Medios de cultivo y soluciones

- Medio de cultivo completo: RPMI o DMEM (HiClone), suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10%, piruvato 1 mM, aminoácidos no esenciales (MEM No-essential aminoacids) 1%, glutamina 200  $\mu$ M (Glutamax), penicilina 10 UI/mL, estreptomycin 10  $\mu$ g/mL, Fungizone 25 ng/mL (Antibiotic-Antimicotic). Todos los reactivos provienen de la empresa Gibco – Life Technologies.
- Tampón fosfato salino 10X pH 7,4 (PBS) (Life Technologies): NaCl 1,5 M +  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  29,7 mM +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10,6 mM
- Medio de cultivo de linfocitos T: RPMI completo +  $\beta$ -mercaptoetanol 25  $\mu$ M
- Medio de congelación: SFB + DMSO 5%
- Tampón de inmovilización a placa:  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M (pH 8,6)
- Tampón de lisis: PBS + metanol frío 10%
- Tampón de unión de anexina V 10X: HEPES 0,1M (pH 7,4); NaCl 1,4M;  $\text{CaCl}_2$  25 mM
- Tampón Hepes salino (HeBS) 2X pH 6,99:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,5 mM + NaCl 0,27 M + Hepes 54 mM

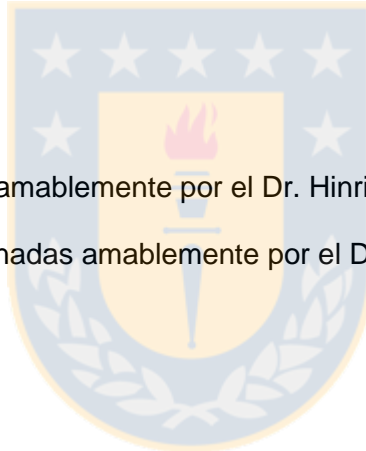
### Anticuerpos y citoquinas

Todos los anticuerpos y citoquinas fueron adquiridos de la empresa BioLegend. Anticuerpos anti CD3-APC (1/167), CD3-PerCpCy5.5 (1/250), CD8-BV421 (1/333), CD8-PE (1/250), CD45.2-PeCy7 (1/250), CD103-PerCpCy5.5 (1/167), CD103-APC

(1/167), CD69-APCCy7 (1/167), IFN- $\gamma$ -APC (1/250), IFN- $\gamma$ -PE (1/250), TNF- $\alpha$ -AF488 (1/167), IgG1-PE (1/500) y los reactivos Anexina-V-APC (1/20-1/40), 7-AAD (1/20-1/40) y Zombie Aqua (1/250). Citoquinas recombinantes de origen murino IL-2, IL-15, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-33.

### **Líneas celulares**

- Phoenix Ampho (ATCC® CRL-3213™)
- NIH 3T3 (ATCC® CRL-1658™)
- B16F10 (ATCC® CRL-6475™)
- B16F10-OVA+
- B16F10-CEA+
- MC38 (Donadas amablemente por el Dr. Hinrich Abken)
- MC38-CEA+ (Donadas amablemente por el Dr. Hinrich Abken)



### **METODOS**

#### **Cultivo, congelación y descongelación de células adherentes**

##### Cultivo celular

Las células se cultivaron en medio de cultivo completo y fueron incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo fue reemplazado cada 48-72 h.

##### Congelación

Se preparó el volumen de medio de congelación necesario según la cantidad de viales a congelar: Se dividió el contenido de una placa de 100 mm o T75 a ~80-90%



de confluencia en 2-3 viales a congelar. Células a un 80-90% de confluencia fueron tripsinizadas por 5 min a 37°C. Luego de centrifugar a 400 g por 5 min, las células fueron resuspendidas en medio de congelación, mantenidas en tanque con isopropanol por 16 h a -80°C para luego ser almacenadas a -80°C hasta su uso.

### Descongelación

Las células fueron descongeladas rápidamente, colocando los criotubos a 37°C hasta derretir el hielo. El contenido de cada vial fue resuspendido en 9 mL de medio de cultivo completo y centrifugado a 400 g por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células en medio de cultivo completo. Finalmente, las células fueron sembradas e incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### **Generación de partículas retrovirales codificantes de CAR**

#### Transfección de línea celular empaquetadora y obtención de partículas retrovirales no replicativas

Se utilizaron células Phoenix Ampho como línea celular empaquetadora, ya que expresan establemente los genes *gag*, *pol* y *env* de retrovirus. Como método de entrega del material genético se utilizó transfección mediante precipitación con CaCl<sub>2</sub>. Previo al día de la transfección (~24 h), las células fueron tripsinizadas como se describió anteriormente. Se sembraron 4x10<sup>5</sup> células en placas de 6 pocillos tratadas para cultivo (Nunclon Delta Surface, Thermo Scientific). Se preparó una solución de HeBS 13 mM y por otro lado una solución de CaCl<sub>2</sub> 0,25 M a la cual se le agregó 5 µg del plásmido codificante para el CAR con el fin de obtener una concentración final de 37 ng/µL. Se mezcló la solución de CaCl<sub>2</sub> conteniendo los plásmidos lentamente con la solución de HeBS y se incubó por 20 min a

temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 270  $\mu\text{L}$  de la solución sobre las células, gota a gota, de tal forma que la solución que contiene los plásmidos se distribuya en todo el pocillo en ausencia de agitación. Las células fueron incubadas durante 16 h a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$ . Luego, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco. El sobrenadante que contiene las partículas retrovirales se recuperó luego de 48-72 h de incubación filtrando el medio de cultivo por filtros de nitrocelulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Biofil) y se almacenó a -80°C hasta su utilización. La determinación del porcentaje de células transfectadas fue realizada por citometría de flujo (BD FACSCANTO II) y analizado utilizando el programa FlowJo\_v10.

#### Cuantificación de sobrenadante retroviral

El sobrenadante que contiene las partículas retrovirales fue titulado mediante transducción de la línea celular de fibroblasto murino NIH 3T3. Para esto, se cultivaron  $5 \times 10^5$  células NIH 3T3 con sobrenadante que contiene las partículas retrovirales no replicativas o medio fresco como control para llegar a un volumen final de 500  $\mu\text{L}$  en placas de 12 pocillos tratadas para cultivo. Se prepararon diluciones de sobrenadante retroviral de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64. Para facilitar la transducción, se suplementó el medio con 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de polibreno y se centrifugó por 90 min a 1200 g a 32°C. Las células se incubaron por 16 h a 37°C para luego reemplazar el medio de cultivo por medio fresco. Posteriormente, se incubaron las células por 48 h y se realizó la medición de la expresión del CAR en la superficie de las células mediante citometría de flujo. El porcentaje de células transducidas se determinó analizando las células positivas para el marcador, asumiendo que una partícula retroviral infecta una célula. Se realizó una curva de titulación graficando el porcentaje de transducción versus la dilución de virus utilizado. Para determinar el número de partículas retrovirales por mL, se graficó la curva de titulación y se

determinó qué valores en la curva se encuentran en el rango lineal aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{U(\text{virus})}{\text{mL}} = \frac{[\text{Número de células}] * [\% \text{ de células transducidas}]}{\text{mL virus stock}}$$

De los valores obtenidos se calculó el promedio para la estimación de la concentración de partículas retrovirales producidas.

#### Generación de línea estable productora de partículas retrovirales no replicativas

Se sembraron  $5 \times 10^5$  células Phoenix Ampho en 500  $\mu\text{L}$  de medio DMEM completo junto con 500  $\mu\text{L}$  de sobrenadante con partículas retrovirales y con 4  $\mu\text{g/mL}$  de polibreno en placas de 24 pocillos tratadas para cultivo. Las células fueron centrifugadas por 90 min a 1200  $g$  a 32°C. Posteriormente, las células fueron incubadas durante 16 h para luego cambiar el medio de cultivo por medio fresco. Luego de este periodo, se incubaron por 48 h y se midió la expresión del CAR en la superficie de las células mediante citometría de flujo usando un anticuerpo contra la región bisagra extracelular del CAR. Posteriormente, se seleccionaron las células CAR+ utilizando un *cell sorter* (FACS Aria II). La recolección de sobrenadante con partículas retrovirales se realizó cultivando  $2 \times 10^6$  células Phoenix Ampho transducidas en medio DMEM completo, en botellas T75 tratadas para cultivo. Cuando el cultivo alcanzó un ~70% de confluencia, el medio fue reemplazado por 5 mL de medio RPMI 1640 completo. Luego de 20 h, el medio de cultivo fue recolectado y se añadieron 5 mL de medio RPMI fresco para realizar una segunda recolección luego de 20 h adicionales. El medio colectado fue filtrado por filtros de

0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Biofil) para ser almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  (tiempo máximo de almacenamiento ~2 meses).

### **Purificación y activación de linfocitos T CD8 murinos**

Los linfocitos T CD8 murinos purificados desde bazo (EasySep™ Mouse CD8+ T Cell Isolation Kit, Stem Cell Technologies #19853) fueron activados con anticuerpos anti-CD3 (Clon 195-2C11) y anti-CD28 (Clon 27.51) unidos a placa. Para esto, se incubó la placa no tratada para cultivo con una solución de anticuerpos a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cada uno diluidos en PBS estéril (3 mL/pocillo para placa de 6 pocillos) a  $4^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Se sembraron  $5 \times 10^5$  linfocitos T/mL en 1 mL de medio de cultivo completo, suplementado con IL-2 50 UI/mL e IL-15 5 ng/mL en la placa tratada con anticuerpos y fueron incubados entre 24-48 h a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$ . Luego de este tiempo, los linfocitos T CD8 fueron recuperados, contados y centrifugados a 400  $g$  por 5 min. Se continuó el cultivo a una concentración entre  $0,5-1 \times 10^6/\text{mL}$  en medio suplementado con citoquinas.

### **Transducción de linfocitos T CD8 con partículas retrovirales codificantes de CAR**

#### Protocolo de transducción retroviral de linfocitos T murinos

Un día antes de la transducción, se cubrieron placas no tratadas para cultivo con retronectina (Takara Bio Inc.) según el protocolo del fabricante. Brevemente, se preparó una solución de retronectina en PBS a una concentración de 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se agregó la solución de retronectina estéril en cada pocillo y se dejó en inmovilización por 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Luego, la solución de

retronectina fue aspirada y se bloqueó cada pocillo con solución de PBS-BSA 2% estéril o medio de cultivo por 20 min. Luego, se agregó el sobrenadante retroviral (2,5 mL para placas de 6 pocillos o 1 mL para placas de 24 pocillos) y la placa fue centrifugada a 2000 *g* por 90 min a 32°C. En este periodo, los linfocitos T a transducir fueron recuperados, contados, centrifugados y llevados a una concentración de  $1 \times 10^6$ / mL en medio de cultivo completo de linfocitos T. Se agregaron 0,5 mL de resuspensión de linfocitos T + 0,5 mL de sobrenadante retroviral. (Volumen final: 1mL para placas de 24 pocillos o 4 mL para placas de 6 pocillos). Se suplementó la solución linfocitos T/retrovirus con IL-2 50 UI/mL e IL-15 5 ng/mL. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante de la placa con retronectina/retrovirus y se agregó la solución de linfocitos T/retrovirus. Se centrifugó a 1200 *g* por 90 min a 37°C. Finalmente, los linfocitos T CD8 fueron incubados a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y se evaluó la expresión del CAR entre 24-48 h post-transducción.

### **Inducción *in vitro* de fenotipo Trm en linfocitos T CD8 murinos**

#### Estandarización del protocolo de incubación con TGF- $\beta$

Para evaluar la acción de TGF- $\beta$  en la inducción de la expresión de marcadores Trm como CD103 y CD69, se activaron linfocitos T CD8 murinos por 48 h y se incubaron con TGF- $\beta$  a distintas concentraciones (2.5, 5, 10, 20 ng/mL) por 48 h adicionales. Para evaluar la acción del tiempo en la expresión de estos marcadores, los linfocitos T CD8 murinos fueron activados por 48 h y luego, incubados con IL-2 50 UI/mL e IL-15 5 ng/mL + TGF- $\beta$  10 ng/mL por periodos de tiempo variables: 24, 48, 72 y 96 h. La expresión de los marcadores de Trm CD69 y CD103, además de otras moléculas fue evaluada por citometría de flujo.

### Efecto de citoquinas sobre la expresión de marcadores de Trm

Para evaluar la acción de otras citoquinas en la inducción de la expresión de marcadores Trm como CD103 y CD69, linfocitos T CD8 murinos fueron activados por 48 h y posteriormente, incubados con distintas combinaciones de citoquinas incluyendo TGF- $\beta$  10 ng/mL, IL-15 5 ng/mL, TNF- $\alpha$  120 ng/mL e IL-33 100 ng/mL. La expresión de los marcadores Trm CD69 y CD103, además de otras moléculas fue evaluada a las 24, 48 y 72 h por citometría de flujo.

### Transducción de linfocitos T CD8 con partículas retrovirales e inducción de fenotipo Trm

Con el fin de evaluar si la transducción de linfocitos T CD8 interfiere en la adquisición de un fenotipo Trm o viceversa, linfocitos T CD8 murinos fueron activados por 48 h en medio de cultivo de linfocitos T para, posteriormente, ser transducidos usando el protocolo de retronectina (descrito anteriormente) e incubados por 24-48 h con las citoquinas TGF- $\beta$  10 ng/mL, IL-15 5 ng/mL, TNF- $\alpha$  120 ng/mL e IL-33 100 ng/mL. La expresión de los marcadores Trm CD69 y CD103, además de otras moléculas fue evaluada por citometría de flujo.

### **Estimulación *in vitro* de linfocitos T-CAR y CAR Trm con proteína CEA**

16-24 h antes de la estimulación de linfocitos T-CAR o CAR Trm, se dejó una placa de fondo plano no tratada para cultivo recubierta con proteína CEA (Fitzgerald) 1  $\mu$ g/mL disuelta en tampón de inmovilización a 4°C (para placas de 96 pocillos recubrir con un volumen de 100  $\mu$ L/pocillo). Al día siguiente, se retiró la solución de CEA y se bloqueó cada pocillo con 100  $\mu$ L de PBS/BSA 1-3% por 20 min a temperatura ambiente. En este periodo, los linfocitos T CD8 fueron recuperados

pipeteando el medio de cultivo repetidas veces e incubados por 10 min a temperatura ambiente. Los linfocitos T CD8 recuperados fueron contados, centrifugados a 400 g por 5 min y resuspendidos en medio de cultivo de linfocitos T a una concentración de  $1 \times 10^6$ /mL. Posteriormente, la solución de PBS/BSA que bloqueaba los pocillos de la placa con CEA fue aspirada y se sembraron 200  $\mu$ L de solución de linfocitos T CD8 en cada pocillo (sembrar  $1 \times 10^5$  LT/pocillo). Se incubó por 20-24 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Se adicionó 50  $\mu$ L de Golgi-Plug BD (Brefeldin A) 0,5% v/v en medio de cultivo de linfocitos y se incubó por 5 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente, se recuperaron los linfocitos T CD8 de la placa y se analizó la expresión de moléculas de activación y efectoras como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  mediante citometría de flujo.

### **Ensayo de citotoxicidad *in vitro* de células tumorales mediada por linfocitos CD8 Trm específicos**

Para evaluar la capacidad de los linfocitos T CD8 con fenotipo Trm generados *in vitro* de reconocer y lisar específicamente sus células blanco, se realizó un ensayo de citotoxicidad *in vitro*. Para esto, las células tumorales blanco fueron plaqueadas el día anterior al cocultivo con las células efectoras. El día del ensayo, se tripsinizaron las células blanco, se sembraron 100  $\mu$ L con  $1-2 \times 10^4$ /pocillo en placa de 96 (por duplicado) y se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Luego, se recuperaron los linfocitos T CD8 específicos o control pipeteando repetidamente de manera suave el medio de cultivo. Estos fueron contados y usados para preparar diluciones seriadas a distintas concentraciones, dependiendo de las relaciones blanco:efector a ensayar (p. ej. 1:5; 1:10; 1:20; 1:40). Los linfocitos T CD8 fueron sembrados (100  $\mu$ L) en los pocillos correspondientes para realizar el cocultivo con las células tumorales blanco

por 4-5 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Además, se destinaron pocillos a la lisis espontánea de células blanco (sin células efectoras) y a lisis máxima (incubados con tampón de lisis). Luego del periodo de cocultivo, se recuperó el contenido de cada pocillo y se lavó una vez con PBS/EDTA 0,5 mM. Para diferenciar células blanco de efectoras, se realizó tinción de superficie marcando CD3, CD8 y CD45.2 (sección abajo) por 20 min a temperatura ambiente o 30 min a 4°C. Las células fueron centrifugadas a 600 g por 3 min, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 200 µL de PBS/SFB 2%. Luego, se realizó una segunda centrifugación, pero el pellet fue lavado con 200 µL de tampón de unión de anexina V. Se preparó la mezcla de reacción con anexina V y 7-AAD en tampón de unión de anexina V a dilución 1:20-1:67 c/u. Las células fueron teñidas por 15 min a temperatura ambiente para, finalmente, sin centrifugar ni descartar el sobrenadante, agregar 180 µL de tampón de unión y adquirir en no más de 1-2 h (se puede mantener hasta 4 h a 4°C en oscuridad).

### **Tinción de células para citometría de flujo**

#### Tinción de superficie

(Para placas de 96 pocillos fondo V o U). Se centrifugó la placa con las células por 3 min a 600 g y se eliminó el sobrenadante. Las células fueron lavadas con 150 µL de PBS-SFB 2%. Se centrifugó por 3 min a 600 g y se eliminó el sobrenadante. Se preparó la dilución apropiada de anticuerpos de superficie y se agregó marcador de viabilidad en PBS-SFB 2% para agregar 50 µL/pocillo. Se incubó por 30 min a 4°C o 20 min a temperatura ambiente en oscuridad. Se centrifugaron las células por 3 min a 600 g y se eliminó el sobrenadante. Las células se lavaron con 150 µL de PBS-SFB 2% 2 veces y se resuspendieron en 200 µL de PBS-paraformaldehído (PFA) 2%.



### Tinción intracelular de citoquinas

Para detectar la producción de citoquinas por parte de los linfocitos Trm específicos activados, se realizó tinción intracelular. Luego de la tinción de superficie (arriba), en vez de resuspender las células en PBS/PFA 2%, se agregaron 100 µL de solución citofix/cytoperm (BD Bioscience, se agrega directamente, sin diluir) por pocillo y se incubó 20 min a 4°C, protegido de la oscuridad. Luego, las células fueron centrifugadas por 3 min a 600 g y lavadas con 150 µl de solución perm/wash (diluir de solución madre 10X con agua estéril). Se realizó una nueva centrifugación a 600 g por 3 min y un nuevo lavado. Se preparó la dilución de anticuerpos para tinción intracelular en perm/wash calculando 50 µL/pocillo. Se incubó por 30 min a 4°C o 20 min a temperatura ambiente protegido de la luz. Luego de esto, se realizaron dos lavados con 150 µL de perm/wash. Las muestras fueron resuspendidas en PBS/SFB 2% o fijadas en PBS/PFA 2% si se requería almacenar a 4°C antes de adquirir.

### **Evaluación de la capacidad antitumoral de linfocitos T CD8 Trm específicos**

#### Inyección de células tumorales

Las células tumorales en ~80% de confluencia fueron plaqueadas un día antes de la inyección. El día de la inyección, fueron tripsinizadas y se evaluó viabilidad por tinción con azul de tripán (se siguió con el protocolo sólo si la viabilidad fue >90%). Se lavó el pellet de células en PBS/SFB 2% frío 2 veces y se centrifugaron a 400 g por 5 min. Luego del último lavado, el pellet se resuspendió en PBS 1X frío y la resuspensión fue pasada por *cell strainer* (BD Bioscience) para generar una suspensión de células individuales. Se inyectaron  $5-7 \times 10^5$  células tumorales en 100 µL de suspensión de manera subcutánea (s.c.) en ratones C57BL/6. El crecimiento

tumoral fue monitoreado diariamente. El volumen tumoral se graficó de acuerdo a la fórmula:

$$\text{Volumen tumoral} = \text{Largo} \times \frac{\text{Ancho}^2}{2}$$

#### Transferencia adoptiva de linfocitos T CD8 en modelos murinos

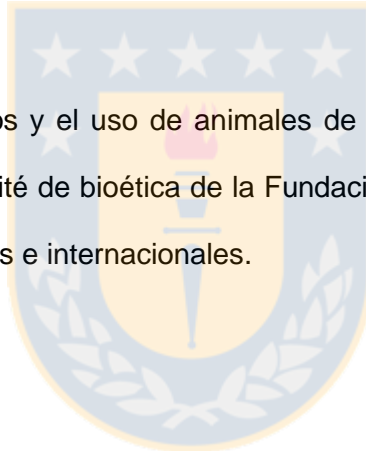
Los linfocitos a inyectar fueron recuperados pipeteando suavemente el medio de cultivo en cada pocillo. Se evaluó viabilidad con azul de tripán. Cuando la viabilidad resultó <85%, los linfocitos muertos fueron eliminados mediante gradiente de Ficoll. Para esto, se dejó que la solución de Ficoll alcanzara temperatura ambiente y se agregó lentamente y al fondo del tubo con la suspensión de linfocitos (3 mL para tubo de 15 mL o 5 mL para tubo de 50 mL). Se realizó una centrifugación por 15 min a 800 g a temperatura ambiente (centrifugar con aceleración rápida y desaceleración sin freno). Posteriormente, se aisló cuidadosamente las células vivas ubicadas en el halo blanco entre las dos fases con una pipeta y se transfirieron a tubo limpio. Se agregó medio de cultivo completo y se centrifugaron a 200 g por 10 min. Las células fueron lavadas 2-3 veces con PBS/SFB frío 2%. Luego del último lavado se evaluó viabilidad con azul de tripán (se siguió sólo si la viabilidad fue >85%). Los linfocitos fueron resuspendidos en volumen apropiado de PBS frío para inyectar de manera intravenosa (i.v.) o intratumoral (i.t.)  $2,5-5 \times 10^5$  LT/ratón. El crecimiento tumoral fue evaluado cada dos días.

## **Análisis estadístico**

Para los análisis estadísticos se utilizó el programa GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc). La comparación estadística entre dos grupos se realizó mediante la prueba t de student. La comparación estadística entre tres o más grupos se realizó mediante test ANOVA. Para la comparación de los volúmenes tumorales *in vivo* se utilizó una prueba t multiparamétrica. En todos los casos se fijó el nivel de significancia de  $p < 0,05$ .

## **Manejo de animales de laboratorio**

Todos los procedimientos y el uso de animales de laboratorio fueron aprobados y supervisados por el comité de bioética de la Fundación Ciencia y Vida y acorde con las normativas nacionales e internacionales.



## RESULTADOS

### Objetivo específico 1: Estandarizar un método *in vitro* de generación de linfocitos T CD8 transducidos con CAR con fenotipo Trm

La primera etapa de este trabajo consistió en estandarizar y optimizar las condiciones del cultivo de linfocitos T CD8 murinos para modular la expresión de marcadores de Trm. Se ha demostrado que la citoquina TGF- $\beta$  es de vital importancia para inducir la expresión de CD103 y en menor medida de CD69 [76,78]. Otras citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-15 e IL-33 también se han visto implicadas en el desarrollo y generación de Trm. El primer paso fue estandarizar la concentración de TGF- $\beta$  a utilizar y el tiempo de incubación de los linfocitos T CD8 con esta citoquina para lograr una expresión eficiente de CD103 y CD69. Para esto, linfocitos T CD8 fueron activados *in vitro* por 48 h con anticuerpos anti CD3 y CD28 inmovilizados en placa y luego, incubados en condiciones clásicas de diferenciación hacia un fenotipo efector por 48 h adicionales; esto es, suplementando el cultivo con IL-2 y/o IL-15 [103] o con distintas concentraciones de TGF- $\beta$ . En la **Fig. 1** se observa que los linfocitos T CD8 activados por 48 h e incubados en medio sin citoquinas por 48 h adicionales expresan las moléculas CD69 y CD103 en un porcentaje cercano al 35% (**Fig. 1A**). La expresión de estos marcadores, principalmente CD103, se ve drásticamente aumentada cuando los linfocitos T CD8 son incubados con TGF- $\beta$  a las concentraciones evaluadas (2,5-5-10 ng/mL), expresión que alcanzó el 95-99% del total (**Fig. 1B-C**). Por el contrario, cuando los linfocitos fueron incubados con IL-2, la expresión de CD103 disminuyó notablemente (**Fig. 1A-C**). Por otro lado, se observó que al mantener TGF- $\beta$  en el cultivo, la expresión de CD103 no disminuyó en el tiempo, manteniéndose alta incluso luego

de 96 h, en comparación a las condiciones con IL-2, IL-15 y sin citoquinas adicionales (**Fig. 2A**). Esto no ocurrió con la expresión de CD69, molécula cuya expresión disminuyó con el tiempo (**Fig. 2B-C**). En resumen, el número de linfocitos T CD8 CD69+CD103+ se elevó cuando estos fueron incubados con TGF- $\beta$ , en comparación a la condición control (sin citoquinas) y a las condiciones clásicas de cultivo *in vitro* de linfocitos T (**Fig. 1C**). Todas las concentraciones de TGF- $\beta$  analizadas generaron un número similar de linfocitos T CD8 CD69+CD103+, porcentaje entre 60-80%, el cual disminuyó levemente luego de 96 h de cultivo (**Fig. 1-2**).

De manera similar, se evaluó la expresión de CXCR3, receptor de las quimioquinas CXCL9 y CXCL10, el cual se ha visto implicado en la migración de linfocitos T CD8 hacia tejidos inflamados, en la extravasación e infiltración de linfocitos T CD8 antitumorales hacia el tumor [104] y en la migración de linfocitos T CD8 efectores hacia la piel y la posterior generación de Trm [76,104,105]. Su expresión se mantuvo elevada en los linfocitos T CD8 cultivados tanto en privación de citoquinas como suplementados con IL-15 y/o TGF- $\beta$ , sin embargo, cuando los linfocitos fueron cultivados en presencia de IL-2, la expresión de CXCR3 disminuyó notablemente y se mantuvo baja mientras la citoquina permaneció en el medio de cultivo, independiente si el medio fue suplementado con IL-15 simultáneamente (**Fig. 3A-B**).

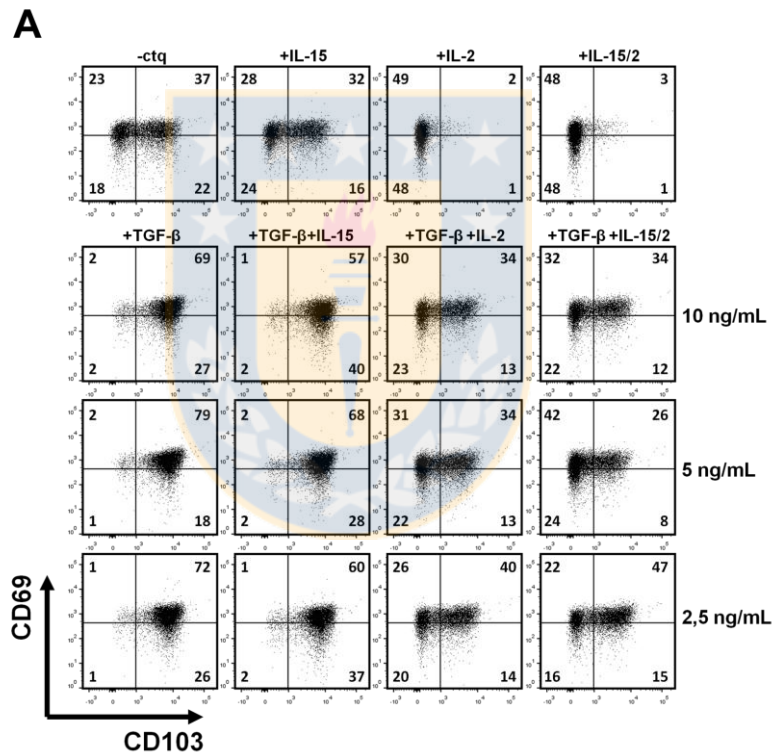
Para evaluar el efecto de otras citoquinas involucradas en la generación de Trm, los linfocitos T CD8 fueron activados por 48 h y posteriormente incubados con distintas combinaciones de citoquinas implicadas en su generación por 48 h adicionales para evaluar la expresión de las moléculas CD69, CD103 y CXCR3. En la **Fig. 4A-B** se observa la expresión de CD103 y CD69 en linfocitos T CD8 luego de 48 h de

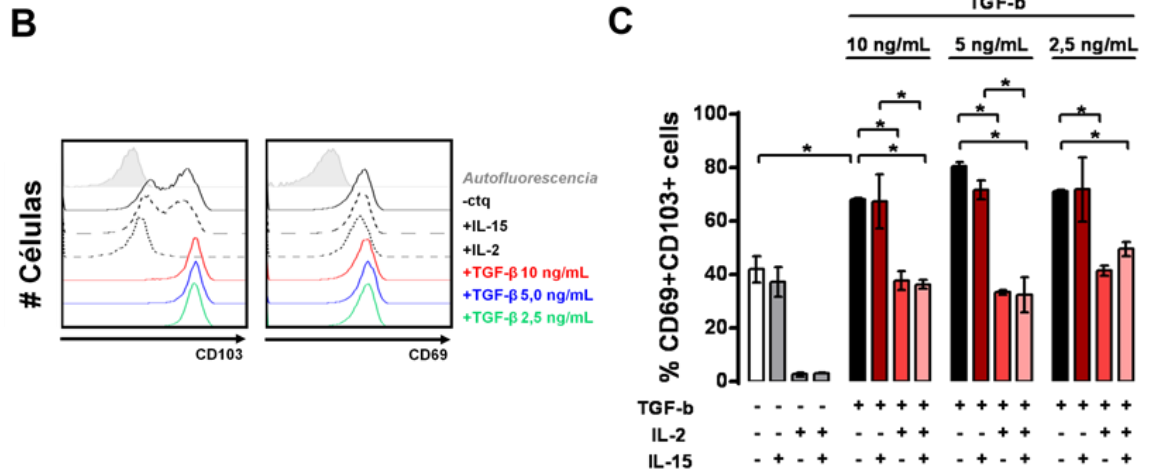
incubación bajo las distintas condiciones de cultivo. La incubación con TGF- $\beta$  generó que prácticamente el 90% de los linfocitos T CD8 expresaran CD103 (**Fig. 4A-B**). Se obtuvieron porcentajes similares incluso cuando TGF- $\beta$  se combinó con IL-15, TNF- $\alpha$  o IL-33, aunque el porcentaje de células CD103+ disminuyó levemente. La única citoquina que generó un aumento significativo del número y expresión de CD103 por sí sola fue TGF- $\beta$  (**Fig. 4C**). La expresión de CD69 se mantuvo similar, independiente de la combinación de citoquinas usada en el cultivo, pero disminuyendo en el tiempo (**Fig. 4C**). En cuanto a la expresión de CXCR3, cuando los linfocitos T CD8 fueron incubados en presencia de TNF- $\alpha$ , la expresión de este receptor disminuyó prácticamente a la mitad al ser comparada con la condición sin citoquinas, incluso combinando TNF- $\alpha$  con otras citoquinas como IL-15 o IL-33 (**Fig. 4D**).

Finalmente, con el fin de generar linfocitos T CD8 antitumorales específicos, se estandarizó el protocolo de generación de linfocitos T-CAR, junto al de inducción de la expresión de marcadores de Trm. Nuevamente, los linfocitos T CD8 fueron activados por 48 h y posteriormente transducidos con partículas retrovirales codificantes del CAR antitumoral anti-CEA e incubados con distintas combinaciones de citoquinas implicadas en la generación de Trm. La eficiencia de transducción de los linfocitos T CD8 no se vio alterada por las condiciones de cultivo, esto es, el porcentaje de linfocitos T-CAR fue relativamente el mismo en todas las condiciones (*figura no mostrada*).

De estos resultados se pueden concluir tres puntos: **1)** Debido a que la expresión y porcentaje de linfocitos T CD8 CD69+CD103+ obtenido fue similar con cualquiera de las concentraciones de TGF- $\beta$  ensayadas y a que la concentración más utilizada

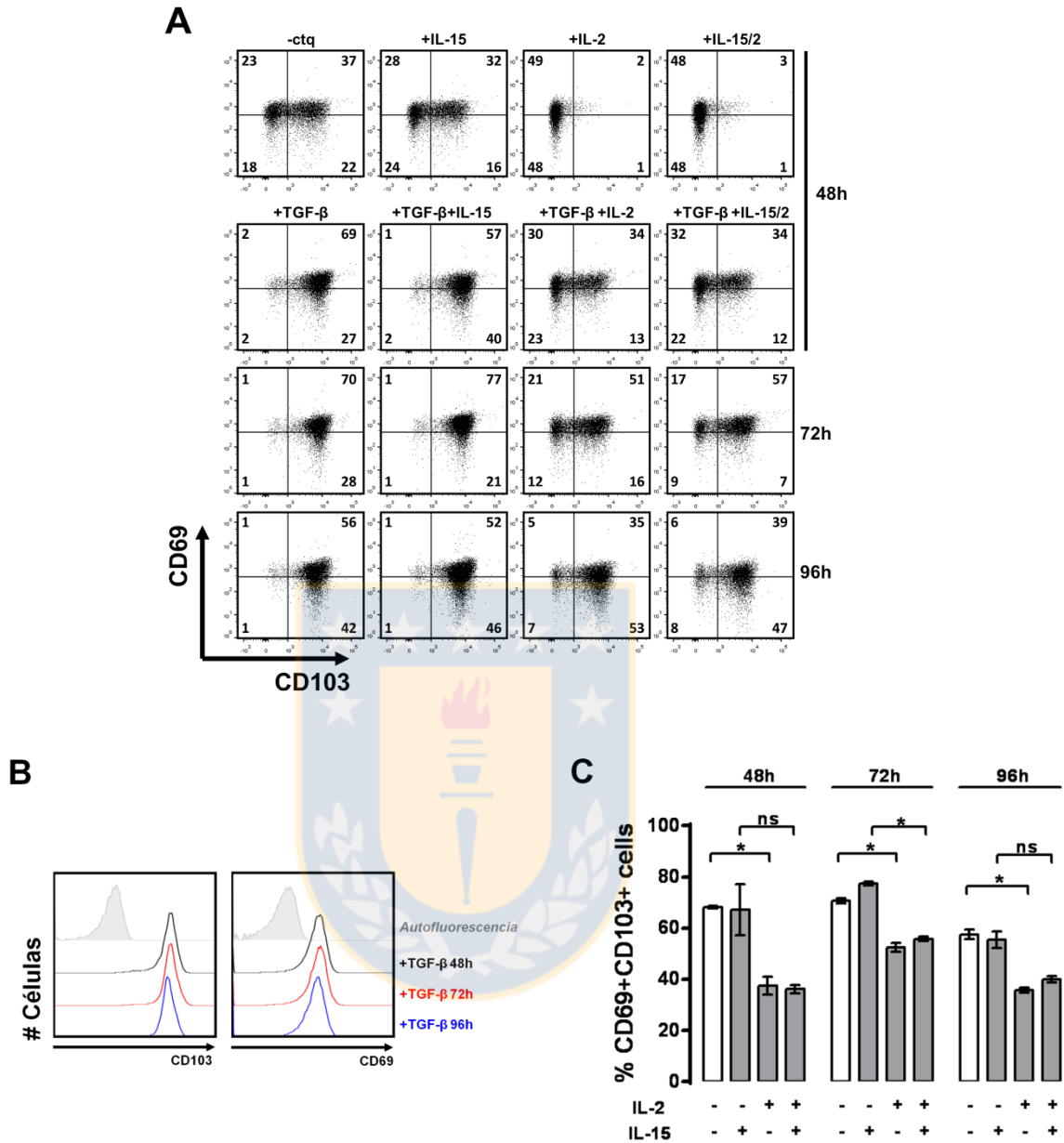
en literatura es 10 ng/mL, se determinó que esta es la concentración de TGF- $\beta$  a utilizar en experimentos posteriores (**Fig. 1-2**); **2**) La incubación de linfocitos T CD8 con IL-2 o TNF- $\alpha$  generó una disminución en la expresión del receptor de quimioquinas CXCR3 (**Fig. 3-4**); **3**) La eficiencia de la transducción de linfocitos T CD8 con el CAR anti-CEA fue similar en todas las condiciones de cultivo analizadas, es decir, las combinaciones de citoquinas implicadas en la generación de Trm no interfieren en la expresión del CAR en la superficie de los linfocitos T CD8.





**Fig. 1. Estandarización de la concentración de TGF-β para el cultivo de linfocitos T CD8 e inducción de un fenotipo Trm.** Los linfocitos T CD8 fueron activados *in vitro* por 48 h y posteriormente incubados con TGF-β en distintas concentraciones. Linfocitos T CD8 incubados en medio sin citoquinas, IL-2 o IL-15 fueron usados como controles. La expresión de marcadores de Trm fue analizada por citometría de flujo. **(A)** Gráficos de puntos representativos de la expresión de CD69 y CD103 en linfocitos T CD8 incubados por 48 h con distintas concentraciones de TGF-β. Se muestra el porcentaje de células positivas para cada marcador en el respectivo cuadrante; **(B)** Histogramas de la expresión de CD69 y CD103 en linfocitos T CD8 incubados con distintas concentraciones de TGF-β, representada como intensidad de fluorescencia en el eje X y número de células en el eje Y; **(C)** Porcentaje de linfocitos T CD8 CD69+CD103+ luego de su incubación por 48 h con distintas concentraciones de TGF-β. Figuras representativas de al menos dos experimentos independientes. Datos analizados con prueba *t* de student,  $p < 0,05$ . Fuente: Elaboración propia.

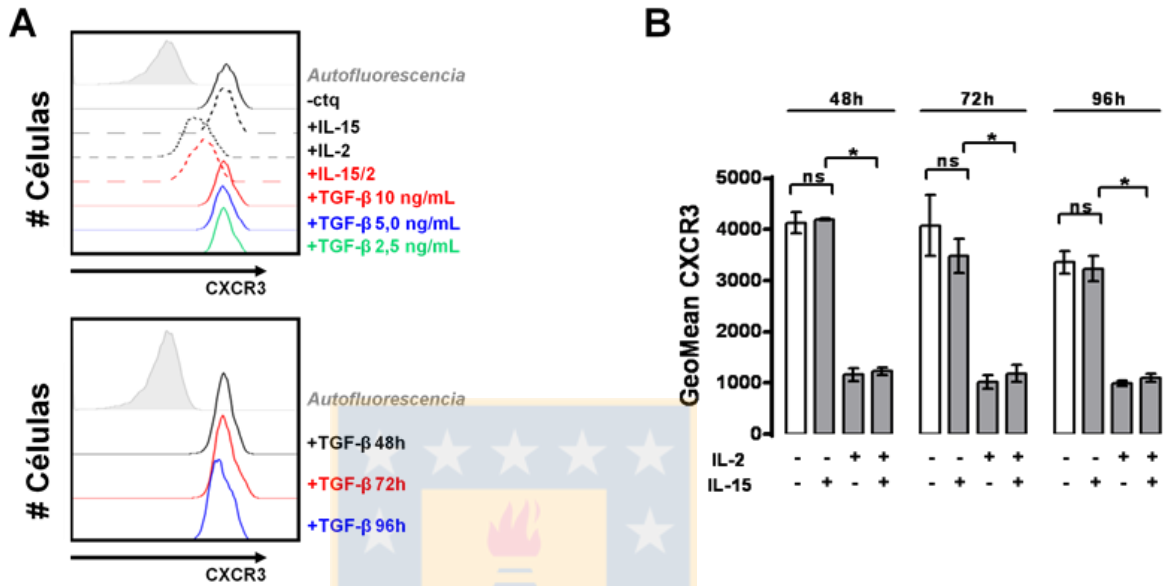




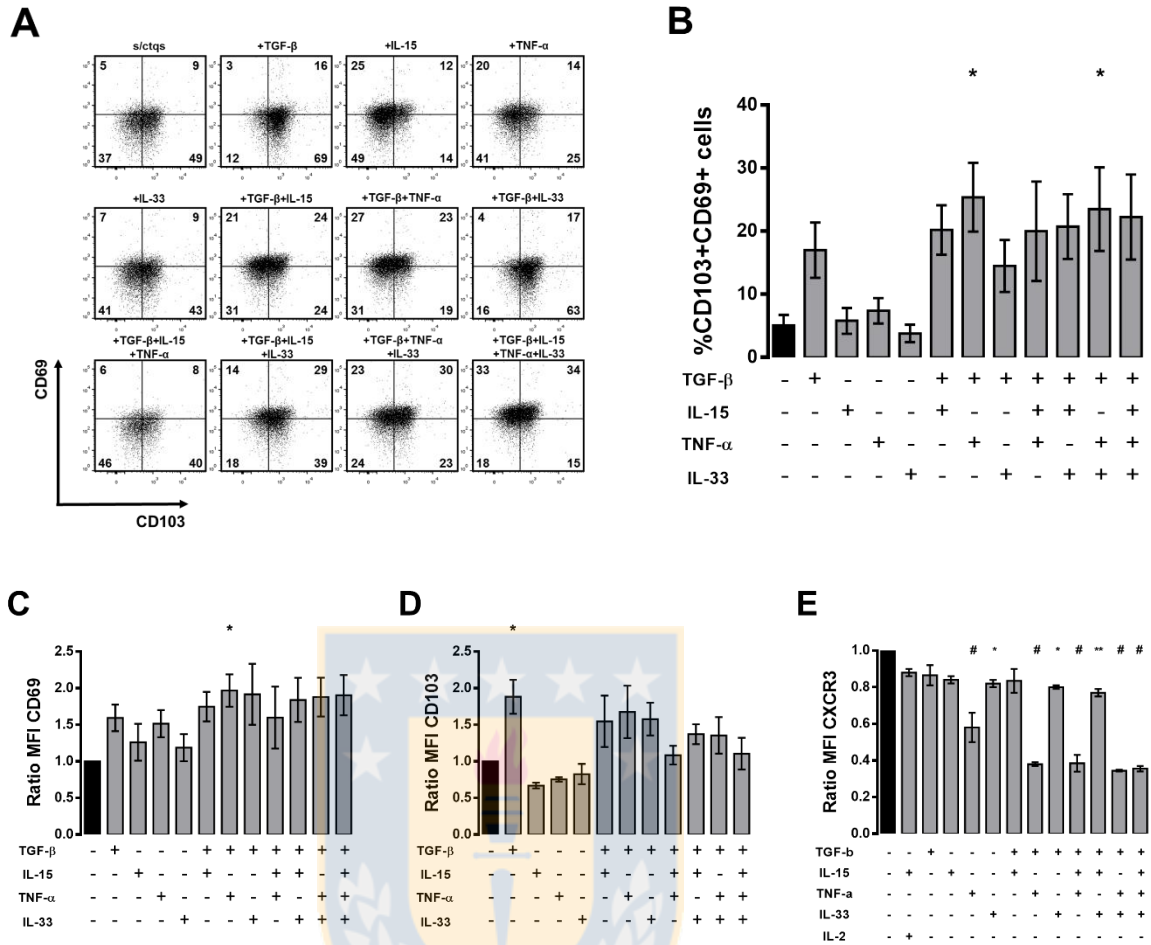
**Fig. 2. Estandarización del tiempo de incubación de linfocitos T CD8 con TGF- $\beta$  para la inducción de un fenotipo Trm.** Los linfocitos T CD8 fueron activados *in vitro* por 48 h y posteriormente incubados con TGF- $\beta$  10 ng/mL por distintos periodos. Linfocitos T CD8 incubados en medio sin citoquinas, IL-2 o IL-15 fueron usados como controles. La expresión de marcadores de Trm fue analizada por citometría de flujo. **(A)** Gráficos de puntos representativos de la expresión de CD69 y CD103 en linfocitos T CD8 incubados por distintos tiempos con TGF- $\beta$  10 ng/mL. Se muestra el porcentaje de células positivas para cada marcador en el respectivo cuadrante; **(B)** Histogramas de la expresión de CD69 y CD103 en linfocitos T CD8 incubados por distintos tiempos, representada como intensidad de fluorescencia en el eje X y número de células en el eje Y; **(C)** Porcentaje de linfocitos T CD69+CD103+ luego de su incubación con TGF- $\beta$  10 ng/mL por distintos tiempos.

Figuras representativas de al menos dos experimentos independientes. Datos analizados con prueba *t* de student,  $p < 0,05$ .

Fuente: Elaboración propia.



**Fig. 3. Efecto de diferentes citoquinas en la expresión de CXCR3 en linfocitos T CD8.** Los linfocitos T CD8 fueron activados *in vitro* por 48 h y posteriormente incubados con TGF- $\beta$  10 ng/mL por distintos periodos. Linfocitos T CD8 incubados en medio sin citoquinas, IL-2 o IL-15 fueron usados como controles. La expresión de CXCR3 fue analizada por citometría de flujo. **(A)** Histogramas de la expresión de CXCR3 en linfocitos T CD8 incubados con TGF- $\beta$  10 ng/mL, IL-2 o IL-15, representada como intensidad de fluorescencia en el eje X y número de células en el eje Y; **(B)** Cuantificación de **(A)**, graficados como intensidad de fluorescencia media geométrica de CXCR3 en linfocitos T CD8. Figuras representativas de al menos dos experimentos independientes. Datos analizados con test multiparamétrico ANOVA. Fuente: Elaboración propia.



**Fig. 4. Inducción de la expresión de marcadores Trm en linfocitos T CD8 modulada por distintas combinaciones de citoquinas.** Linfocitos T CD8 fueron activados *in vitro* por 48 h e incubados con distintas combinaciones de citoquinas implicadas en la generación de Trm por 48 h adicionales. Se evaluó la expresión de los marcadores de Trm CD69 y CD103 y la expresión de CXCR3 mediante citometría de flujo. **(A)** Gráficos de puntos representativos de la expresión de CD69 y CD103 en linfocitos T CD8 incubados con distintas combinaciones de citoquinas por 48 h. Se muestra el porcentaje de células positivas para cada marcador en el respectivo cuadrante; **(B)** Porcentaje de linfocitos CD69+CD103+ dentro de la población CD8; **(C)** Expresión de CD69 (izquierda), CD103 (centro) y CXCR3 (derecha) en linfocitos T CD8. Datos expresados como relación de la expresión de estas moléculas en linfocitos T CD8, normalizados contra la condición sin citoquinas. Figuras representativas de al menos dos experimentos independientes. Datos analizados con test multiparamétrico ANOVA. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; #  $p < 0,0001$ ). Fuente: Elaboración propia.

**Objetivo específico 2: Evaluar *in vitro* la activación específica de los linfocitos T CD8 con un fenotipo Trm y compararlos con linfocitos T CD8 activados convencionalmente**

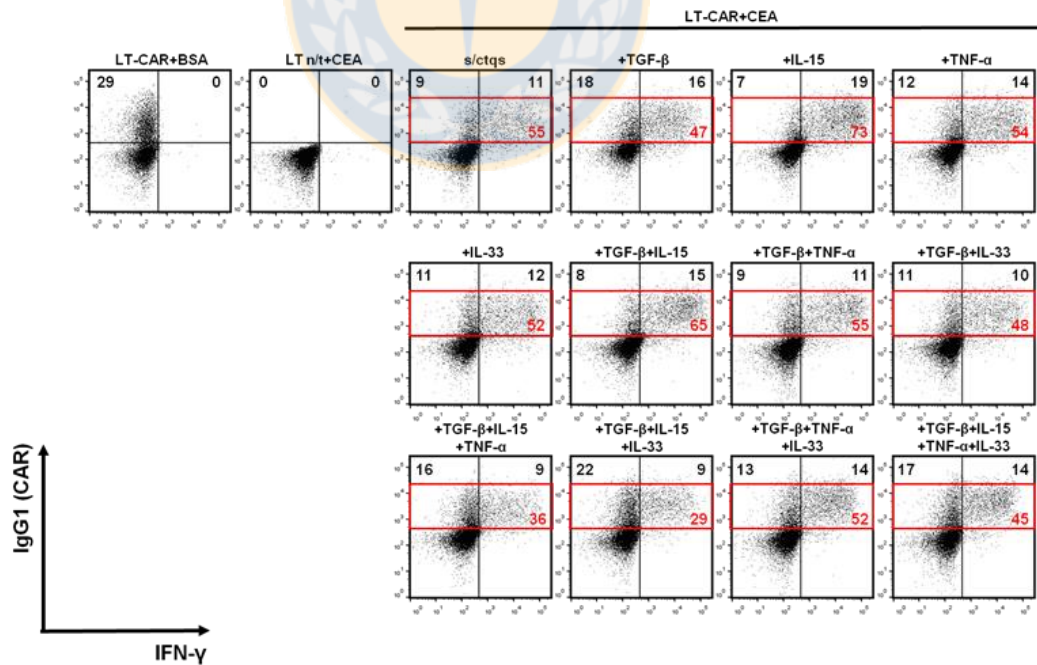
Luego de estandarizar el protocolo de cultivo *in vitro* de linfocitos T CD8 murinos para expresar los marcadores de Trm y lograr su transducción eficiente con el CAR antitumoral anti-CEA, se evaluó la capacidad de los linfocitos T-CAR de ser activados por su antígeno específico, en este caso, CEA. Luego de una activación *in vitro* por 48 h, los linfocitos T CD8 fueron transducidos con partículas retrovirales codificantes del CAR y simultáneamente fueron incubados con distintas citoquinas implicadas en la generación de Trm por 48 h adicionales. Se realizó una ronda de transducción en las 24 h iniciales del periodo de diferenciación al fenotipo Trm. Posteriormente, los linfocitos T-CAR Trm fueron activados en presencia de CEA por 24 h para, finalmente, realizar una tinción intracelular de citoquinas y evaluar la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Como proteína control se utilizó BSA. Se observaron diferencias en la activación específica de estos linfocitos, donde la condición más activa resultó ser aquella donde fueron diferenciados sólo en presencia de IL-15. El porcentaje de linfocitos T CD8 productores de IFN- $\gamma$  fue aproximadamente el 70% de todos los linfocitos T-CAR (**Fig. 5A**). La incubación con TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-33 o cualquier otra combinación disminuyó este porcentaje (**Fig. 5B**). Los resultados muestran que los linfocitos T-CAR incubados en la condición TGF- $\beta$ +IL-15 fueron capaces de ser activados por el CEA, donde alrededor del 50-60% de los linfocitos T-CAR produce IFN- $\gamma$ , la diferencia con las demás condiciones de cultivo fue notoria, sin embargo, si se compara con la condición de cultivo sin citoquinas, esta diferencia no alcanzó la significancia estadística. Por el contrario, cuando se comparó con la condición IL-15, se vio una disminución estadísticamente

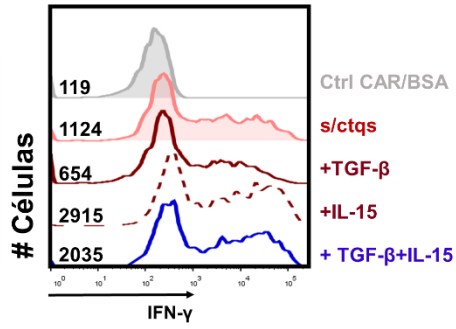
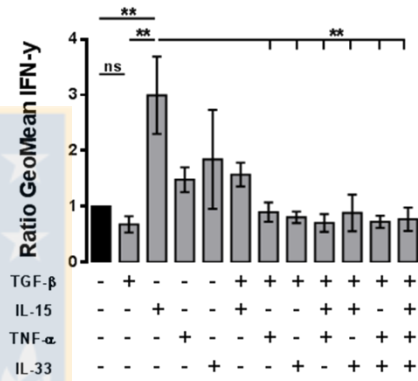
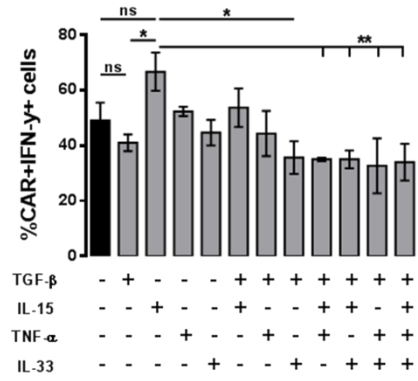
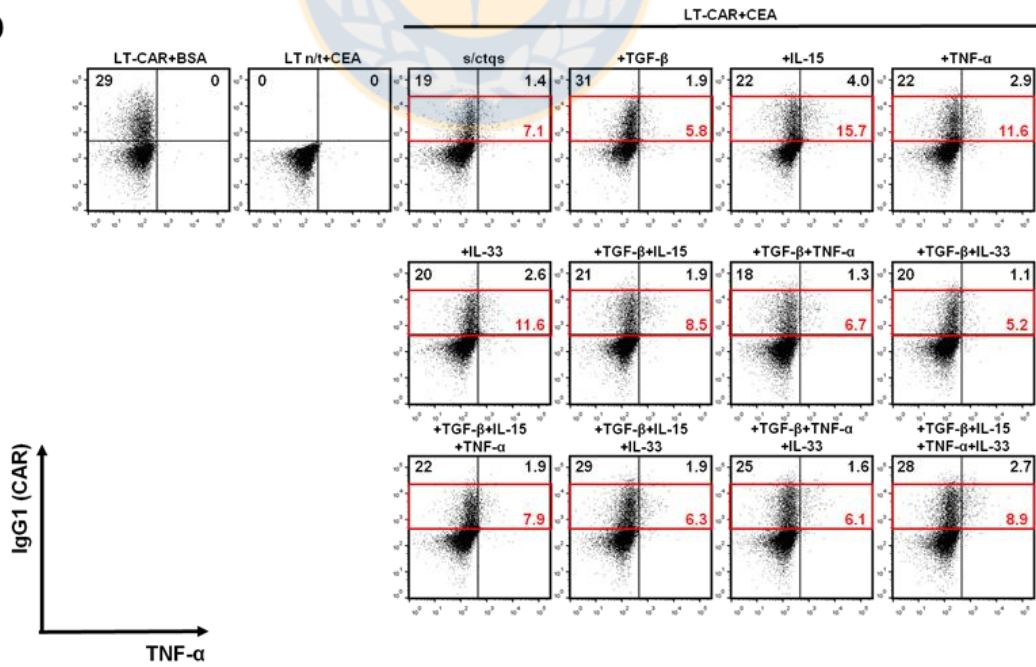
significativa en la activación en prácticamente todas las condiciones de cultivo restantes (excluyendo la condición TGF- $\beta$ +IL-15), observándose una tendencia entre la disminución de la activación y la incubación de los linfocitos T con múltiples citoquinas (**Fig. 5B-C**). De manera similar, la intensidad de fluorescencia media, que denota la expresión de una molécula por una población celular, se vio estadísticamente aumentada cuando los linfocitos T fueron incubados con IL-15 en comparación a la condición de cultivo de privación de citoquinas, donde se observó un aumento de casi 3 veces en la expresión de IFN- $\gamma$  (**Fig. 5C**). Se evaluó también la expresión de TNF- $\alpha$  por los linfocitos T-CAR, sin embargo, su producción no pudo ser detectada de manera tan evidente como sucedió con IFN- $\gamma$  (**Fig. 5D**). De nuevo, los linfocitos T-CAR CD8 más activos fueron aquellos incubados con IL-15, seguidos de los incubados con la combinación de TGF- $\beta$ +IL-15 (**Fig. 5E-F**).

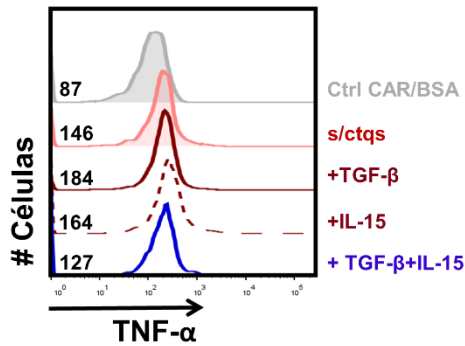
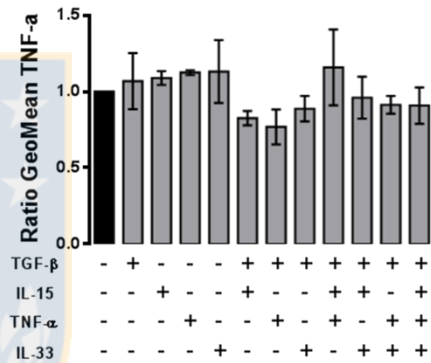
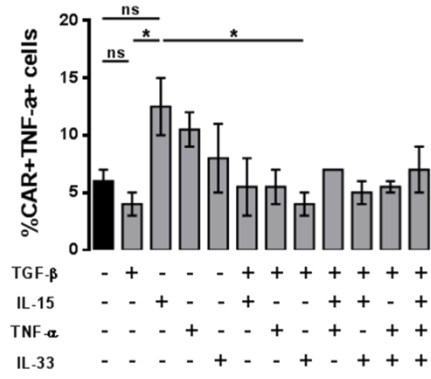
Posteriormente, para evaluar el efecto de la adquisición de un fenotipo Trm por parte de los linfocitos T CD8 murinos sobre su capacidad citotóxica, se realizó un ensayo de citotoxicidad *in vitro*. Para esto, y debido principalmente a la disponibilidad de linfocitos T específicos y a las ventajas del modelo, linfocitos T CD8 OT-I, los cuales poseen un TCR específico contra el péptido inmunodominante de la proteína ovoalbúmina (OVA<sub>257-264</sub>; SIINFEKL) fueron activados por 48 h y luego incubados en condiciones clásicas para diferenciación a linfocitos T efectores (IL-2+IL-15) o en la condición de inducción del fenotipo Trm obtenida de los resultados anteriores (TGF- $\beta$ +IL-15) por 48 h adicionales. Finalmente, los linfocitos T CD8 específicos generados fueron cocultivados en distintas proporciones con células tumorales blanco, las cuales expresan la proteína OVA (B16F10-OVA+) por 4-5 h. La lisis específica de las células blanco fue evaluada mediante la incorporación de 7-AAD y la unión de anexina V a fosfatidilserina en su membrana (**Fig. 6A**). Como

controles se utilizaron células B16F10 WT. En la **Fig. 6B** se muestra un esquema representativo de la lisis específica de células tumorales mediada por los linfocitos T CD8 OT-I específicos, analizando los parámetros antes mencionados. Se pudo observar que la lisis específica de células blanco control se mantuvo similar cuando fueron cocultivadas con linfocitos T OT-I. Por el contrario, cuando los linfocitos T OT-I fueron cocultivados con células blanco OVA+, se observó un aumento en la lisis de estas células, tanto en el porcentaje de células 7-AAD+ (necróticas) como en las células anexina V+ (apoptóticas), el cual aumentó a medida que se aumentó la relación efector:blanco. La incubación de los linfocitos T OT-I en condiciones Trm, es decir, en presencia de TGF- $\beta$ +IL-15 no afectó significativamente su capacidad citotóxica en las condiciones blanco:efector altas, sin embargo, se notó una disminución leve (**Fig. 6C**).

**A**

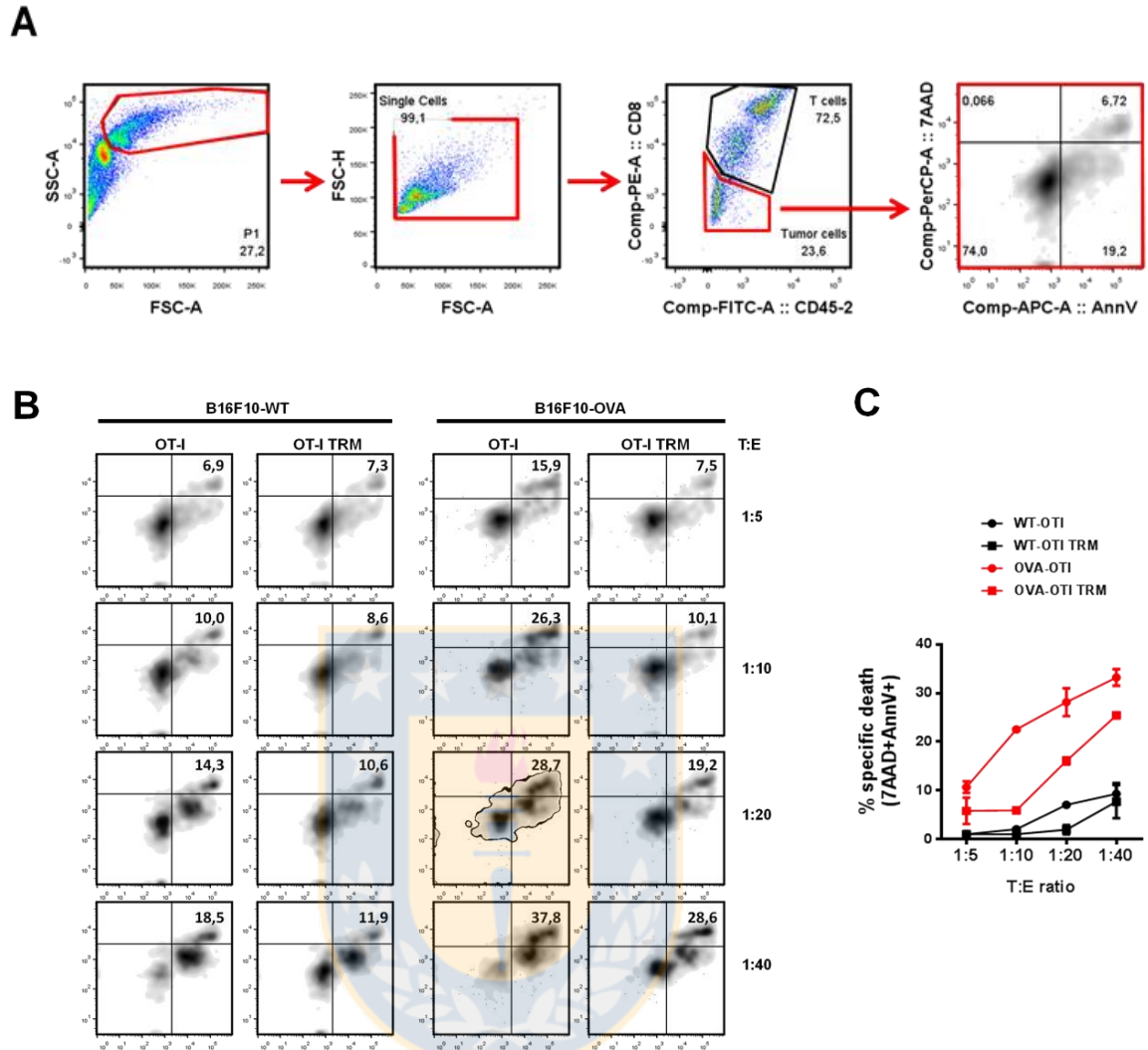


**B****C****D**

**E****F**

**Fig. 5. Activación específica de linfocitos T CD8 con fenotipo Trm generados *in vitro*.** Linfocitos T CD8 fueron activados *in vitro* por 48 h y luego transducidos con CAR anti-CEA e incubados con distintas combinaciones de citoquinas por 48 h adicionales. Los linfocitos T-CAR generados fueron activados por 24 h en presencia de CEA o BSA como control negativo. La expresión de las moléculas de activación (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) fue analizada por citometría de flujo. **(A)** Gráficos de puntos representativos de la expresión del CAR anti-CEA (IgG1) y de IFN- $\gamma$  en linfocitos T CD8 incubados con distintas citoquinas; **(B)** Histogramas representativos de la expresión de IFN- $\gamma$ ; **(C)** Porcentaje de linfocitos CAR+IFN- $\gamma$ + (arriba) y expresión de IFN- $\gamma$  en linfocitos T CD8 (abajo); **(D)** Gráficos de puntos representativos de la expresión del CAR anti-CEA (IgG1) y de TNF- $\alpha$  en linfocitos T CD8 incubados con distintas citoquinas; **(E)** Histogramas representativos de la expresión de TNF- $\alpha$ ; **(F)** Porcentaje de linfocitos CAR+TNF- $\alpha$ + (arriba) y expresión de TNF- $\alpha$  en linfocitos T CD8 (abajo). **(C-E)** Datos presentados como relación de la expresión (GeoMean) de IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  en linfocitos T CD8. **(A y D)** Se muestra el porcentaje de células positivas para cada marcador en el respectivo cuadrante. **(B y E)** Datos representados como intensidad de fluorescencia en el eje X y número de células en el eje Y, los números representan la intensidad media de fluorescencia. Datos normalizados contra la condición sin citoquinas. Figuras representativas de al menos dos experimentos independientes. Datos analizados con test multiparamétrico ANOVA.  $p < 0,05$ . Fuente: Elaboración propia.



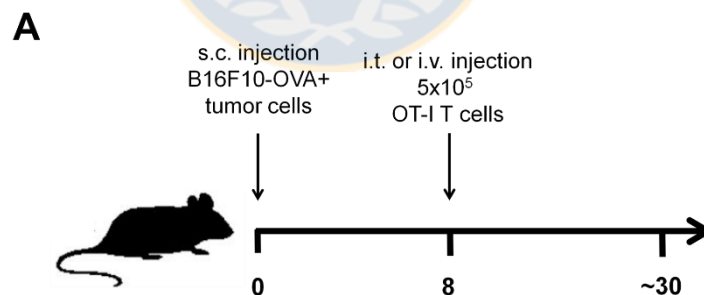


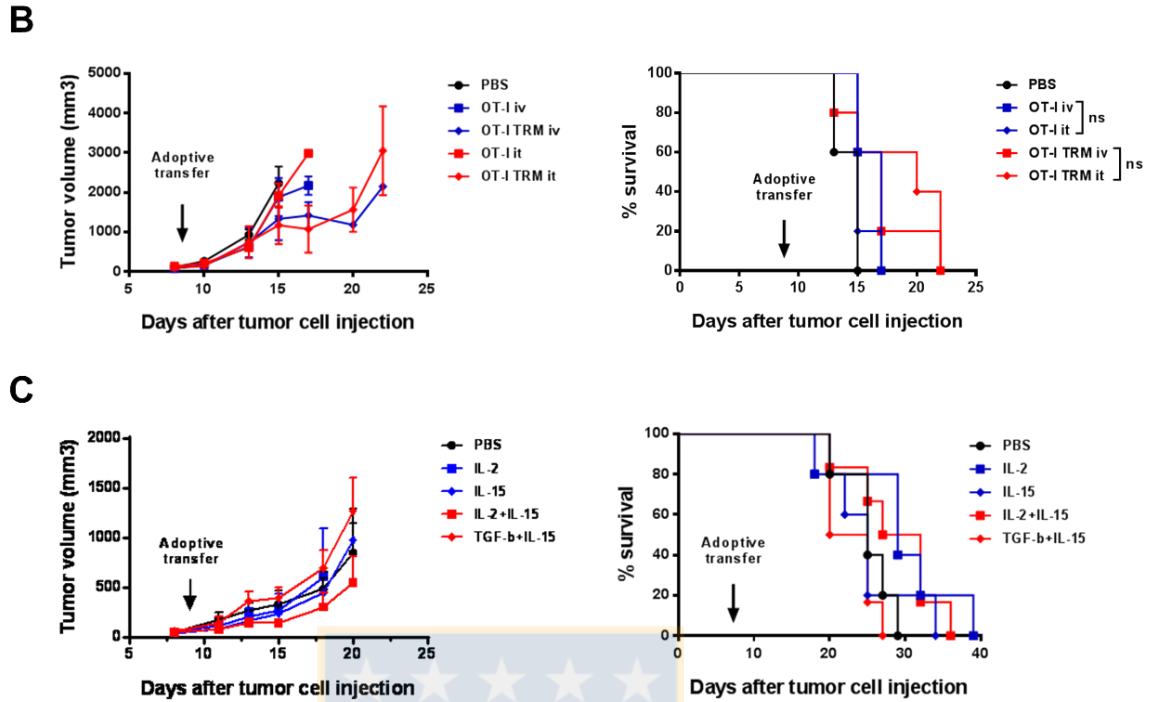
**Fig. 6. Citotoxicidad específica mediada por linfocitos T CD8 con fenotipo Trm generados *in vitro*.** Linfocitos T CD8 OT-I fueron activados *in vitro* por 48 h y posteriormente incubados con IL-2 + IL15 (cásico) o TGF- $\beta$ +IL-15 por 48 h adicionales para inducir expresión de marcadores de Trm. Los linfocitos generados fueron cocultivados por 4-5 h con  $1-2 \times 10^4$  células tumorales blanco OVA+ en distintas proporciones efector:blanco. Como control se utilizaron células blanco OVA-. La lisis específica de las células blanco se evaluó por la incorporación de 7-AAD y la unión de anexina V. **(A)** Estrategia de análisis del ensayo de citotoxicidad; **(B)** Gráficos de densidad representativos de la incorporación de 7-AAD y la unión de anexina V a las células tumorales blanco **(C)** Lisis específica de células blanco mediada por linfocitos OT-I u OT-I Trm. Datos representados como muerte específica (células 7-AAD+ Anexina V+). Los números en cada gráfico representan el porcentaje relativo de la población celular seleccionada. Figuras representativas de dos experimentos independientes. Datos analizados con prueba *t* student.  $p < 0,05$ . Fuente: Elaboración propia.

**Objetivo específico 3. Evaluar la capacidad de los linfocitos T CD8 con un fenotipo Trm de reducir el tamaño de tumores sólidos en modelos murinos in vivo**

Finalmente, se analizó *in vivo* la capacidad antitumoral de los linfocitos T CD8 Trm generados *in vitro* evaluando su capacidad para suprimir el crecimiento tumoral de tumores B16F10-OVA+ en ratones de la cepa C57BL/6 los cuales fueron inyectados de manera s.c. con células tumorales B16F10-OVA+ y 7-8 días después fueron inyectados de manera i.v. o i.t. con linfocitos T CD8 OT-I, clásicamente activados, o bien cultivados en condiciones Trm (**Fig. 7A**). En estos experimentos, la transferencia de linfocitos T se realizó de manera i.v. e i.t., de manera de comparar el fenotipo de los linfocitos y la ruta de administración de manera independiente. Además, se inyectó de manera i.t. aprovechando la característica de los Trm de residir en tejidos y no recircular. Para evaluar este punto, se probaron distintas aproximaciones. La primera fue utilizar un cóctel de citoquinas completo de inducción del fenotipo Trm, es decir, todas las citoquinas implicadas en su generación analizadas en este trabajo (TGF- $\beta$ +IL-15 o TGF- $\beta$ +IL-15+TNF- $\alpha$ +IL-33). El fundamento del uso de esta combinación particular de citoquinas fue que, a pesar de tener una capacidad efectora menor (menor activación, **Fig. 5**), presentarían un fenotipo Trm (**Fig. 4**) por lo cual infiltrarían el tumor más eficientemente y permanecerían por más tiempo retenidos ejerciendo su acción antitumoral. Sin embargo, a pesar de que se observó un retardo en el crecimiento del tumor en los ratones transferidos con linfocitos T CD8 OT-I Trm inyectados por ambas rutas, esta diferencia no alcanzó a ser estadísticamente significativa (**Fig. 7B**). Posteriormente, se probó otra aproximación, en la cual los linfocitos T CD8 OT-I fueron diferenciados hacia un fenotipo Trm en presencia sólo de TGF- $\beta$ +IL-15 por 48 h (combinación más activa luego de la condición solo IL-15, donde se obtuvo un equilibrio entre la

expresión de marcadores Trm y su activación. **Fig. 4-5**). Además, los linfocitos solo fueron transferidos de forma i.v., considerando que es la forma en la cual se realiza la transferencia adoptiva de linfocitos T de manera convencional. Por otra parte, ya que se observó una disminución notoria de la expresión del receptor de quimioquinas CXCR3 en presencia de IL-2 (**Fig. 1-3**), se incubaron linfocitos T CD8 OT-I en condiciones clásicas de cultivo, es decir, en presencia de IL-2, IL-15 e IL-2+IL-15, de manera de comparar estas condiciones junto a la condición de inducción de fenotipo Trm y abordar la posible contribución de CXCR3 en la migración de los linfocitos transferidos hacia el tumor. Desafortunadamente, el experimento no funcionó; ninguno de los grupos de ratones fue protegido por los linfocitos T transferidos, no se observó un retardo en el crecimiento tumoral ni un aumento en la sobrevivencia de los ratones, incluso los ratones transferidos con linfocitos OT-I diferenciados en presencia de IL-2 no presentaron control del crecimiento tumoral ni aumento en su sobrevivencia en comparación al grupo control (**Fig. 7C**).





**Fig. 7. Reducción tumoral mediada por linfocitos T CD8 con un fenotipo Trm generados *in vitro*.** Ratones C57 hembras de aproximadamente 8 semanas fueron inyectados de manera s.c. con  $5 \times 10^5$  células tumorales B16F10-OVA. 7-8 días después, los ratones fueron transferidos con linfocitos T CD8 murinos, los cuales fueron activados por 48 h e incubados en condiciones Trm por 48 h adicionales. El crecimiento tumoral fue monitoreado cada dos días. **(A)** Esquema general del diseño experimental; **(B)** Curvas de crecimiento tumoral (izquierda) y sobrevida (derecha) de ratones con tumores OVA+ transferidos con linfocitos T OT-I u OT-I Trm de manera i.v. o i.t.; **(C)** Curvas de crecimiento tumoral (izquierda) y sobrevida (derecha) de ratones con tumores OVA+ transferidos de manera i.v. con linfocitos T OT-I diferenciados en condiciones clásicas de cultivo (IL-2, IL-15 o ambas citoquinas) o en condiciones favorables para Trm (TGF- $\beta$ +IL-15). Curvas de sobrevida analizadas por test log Rank.  $P < 0,05$ . Fuente: Elaboración propia.

## DISCUSIÓN

El desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer, más eficientes y que mejoren la calidad de vida de los pacientes es absolutamente necesario. En las últimas décadas surge una nueva aproximación que usa las capacidades del sistema inmune para eliminar células cancerígenas. La inmunoterapia antitumoral ha emergido como una nueva estrategia para combatir el cáncer, evitando efectos adversos graves, y que ha tenido grandes avances aumentando significativamente la supervivencia de pacientes con distintos tipos de tumores [9,20-22].

Dentro de las inmunoterapias más prometedoras en desarrollo se encuentra el tratamiento con linfocitos T-CAR, sin embargo, aún no se tiene certeza de cuál es la mejor subpoblación de linfocitos T para modificar y transferir a los pacientes [106]. En este contexto, hay autores que demuestran que son los linfocitos T de memoria los que poseen una mayor actividad antitumoral, y que por ende debería ser la subpoblación de elección para expresar un CAR y ser transferidos a los pacientes. Por otro lado, en los últimos años se ha descubierto la existencia de linfocitos T de memoria residente de tejidos o Trm, los cuales, justamente, permanecen en los tejidos por largos periodos, poseen una potente acción efectora y han sido asociados con buen pronóstico y mejor supervivencia en pacientes con distintos tipos de cáncer [76,92,99,102].

En este trabajo de tesis se estableció un protocolo eficiente de generación de linfocitos T-CAR anti-CEA, los cuales, a su vez, fueron inducidos para expresar un fenotipo de linfocitos Trm, con el objetivo de promover su capacidad antitumoral, mejorando su infiltración y persistencia. En contraste con los resultados obtenidos

para cánceres hematológicos, la baja eficacia de la mayoría de los linfocitos T-CAR en tumores sólidos debido a su baja infiltración y persistencia *in vivo* [64,107], nos llevó a la búsqueda de aumentar la capacidad antitumoral de los linfocitos T-CAR utilizados en protocolos de inmunoterapia.

### **Estandarización de un método *in vitro* de generación de linfocitos T CD8 transducidos con CAR con fenotipo Trm**

Como primer paso para desarrollar este trabajo, se buscó generar un protocolo eficiente de diferenciación de linfocitos T CD8 murinos hacia un fenotipo Trm y su transducción con partículas retrovirales codificantes de un CAR antitumoral anti-CEA, de manera de redirigir una respuesta inmune específicamente contra las células tumorales. Se sabe que TGF- $\beta$  es de vital importancia para inducir la expresión de la molécula CD103 y en menor medida de CD69 [76,78]. Estas moléculas funcionan como los marcadores de superficie por excelencia para caracterizar Trm. Nuestros resultados muestran que la incubación con TGF- $\beta$  aumenta significativamente la expresión de estos marcadores y el número de linfocitos T CD8 CD69+CD103+ en comparación al cultivo en medio carente de citoquinas o en condiciones de diferenciación clásicas a un fenotipo efector. El porcentaje de linfocitos T CD8 CD69+CD103+ llega casi al 70% del total de linfocitos al ser incubados sólo con TGF- $\beta$  o en combinación con IL-15, la cual es importante para el desarrollo de linfocitos Trm en algunos tejidos [71,72]. Por el contrario, en ausencia de TGF- $\beta$  o en presencia de IL-2, el porcentaje de linfocitos T CD69+CD103+ se mantiene al nivel del control sin citoquinas. **(Fig. 1-2)**. Algunos reportes dan cuenta del cultivo *in vitro* de linfocitos T para la inducción de CD103 y CD69 utilizando TGF- $\beta$  y/u otras citoquinas; en este caso, al cultivar linfocitos T

(previamente activados *in vivo*) por 40 h sólo con TGF- $\beta$  10 ng/mL, se evidencia un notorio aumento en la expresión de CD103, no así en CD69, el cual se mantiene similar a la condición control sin citoquinas [78]. En este contexto, a pesar que en otros reportes se han utilizado concentraciones más bajas para inducir la expresión de marcadores Trm en linfocitos T murinos, de aquí en adelante, los experimentos fueron realizados con TGF- $\beta$  10 ng/mL.

Otra molécula que se ha visto implicada en el desarrollo de linfocitos Trm es el receptor de quimioquinas CXCR3 [76]. Nuestros resultados indican que la expresión de CXCR3 se mantiene alta cuando los linfocitos T CD8 son incubados con IL-15 o TGF- $\beta$ , similar al control sin citoquinas. Por el contrario, en presencia de IL-2 la expresión de CXCR3 disminuye drásticamente, independiente de las citoquinas en el cultivo y del tiempo (**Fig. 3**). Existen reportes de la modulación de la expresión de CXCR3, estrictamente hablando, de la disminución mediada por IL-2 y otras citoquinas como TNF- $\alpha$ , sin embargo, estos trabajos fueron realizados en otros tipos celulares, por ejemplo, neuronas [108,109]. En nuestro caso, es relevante que la incubación de linfocitos T CD8 en condiciones de inducción de fenotipo Trm no disminuya la expresión de CXCR3, el cual es fundamental en la migración de linfocitos T y en el desarrollo de una respuesta antitumoral [104,110]. Es más, es particularmente relevante que la incubación de linfocitos T CD8 con IL-2 disminuya notablemente la expresión de CXCR3, ya que la mayoría de los protocolos de expansión de linfocitos T para ser utilizados en transferencia adoptiva se realizan en presencia de altas concentraciones de esta citoquina, lo que podría interferir en la migración, extravasación e infiltración del tumor por los linfocitos transferidos y, por lo tanto, con la terapia.

Para transducir linfocitos T CD8 murinos se utilizan partículas gama-retrovirales, por lo cual es necesario tener linfocitos T en etapa de proliferación para ser infectados y que el gen de interés se integre en su genoma. Esto es una desventaja, ya que la posibilidad de transducir y transferir linfocitos T vírgenes, los cuales tendrían una mayor capacidad antitumoral, se ve postergada [111]. En nuestro laboratorio, el método de transducción de linfocitos T murinos con partículas retrovirales codificantes de CAR se encuentra estandarizado y consiste básicamente en la activación *in vitro* inicial de los linfocitos T con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 por 48 h en presencia de las citoquinas IL-2 e IL-15 y posterior transducción, estrategia similar a la usada convencionalmente en protocolos de expansión de linfocitos T para ser utilizados en transferencia adoptiva [112]. Sin embargo, si la eficiencia de la transducción y posterior expresión del CAR se ve afectada por distintas citoquinas o condiciones de cultivo, o si un determinado tipo o subpoblación de linfocitos T es transducido de manera más eficiente es desconocido. En nuestro diseño experimental, la incubación de linfocitos T CD8 con diferentes citoquinas (o combinación de estas) implicadas en la expresión de marcadores de Trm no influyó en la eficiencia de la transducción; si bien la eficiencia de la transducción de linfocitos T incubados en medio sin citoquinas (control) o sólo con TGF- $\beta$  fue levemente más baja, el porcentaje de linfocitos T-CAR fue similar en todas las condiciones y varió entre 25-35% evaluado luego de 24 h post-transducción. Este efecto se debe probablemente a que la proliferación de los linfocitos, necesaria para ser eficientemente transducidos, es menor en estas condiciones, donde IL-2 e IL-15, importantes para este proceso están ausentes. Por otro lado, ha sido reportado previamente en otros trabajos en modelos murinos que el CAR es internalizado cuando los linfocitos T están activados [113], por lo que el porcentaje de linfocitos T-CAR puede disminuir con el paso de los días. Efectivamente, el porcentaje de



linfocitos T-CAR disminuyó cuando su expresión fue analizada 48 h luego de una ronda de transducción, sin embargo, de nuevo el porcentaje fue similar en todas las condiciones analizadas (*figura no mostrada*). Este fenómeno debe ser estudiado, especialmente si existen proyecciones clínicas.

Por otro lado, la incubación de linfocitos T CD8 con TGF- $\beta$  aumenta el porcentaje de linfocitos T CD69+CD103+, sin embargo, no logró alcanzar la significancia estadística, solamente se observó un aumento significativo cuando los linfocitos T CD8 fueron incubados con TGF- $\beta$  en combinación con TNF- $\alpha$  y/o IL-33 comparado con el control sin citoquinas (**Fig. 4**) pese a que la tendencia al aumento se observó todas las condiciones donde se combinaba TGF- $\beta$  con otra citoquina, haciendo evidente la importancia de esta molécula. La incubación de linfocitos T CD8 con IL-15, TNF- $\alpha$  o IL-33 de manera independiente no provocó cambios en el porcentaje ni en la expresión de estos marcadores, a diferencia de lo reportado por otros autores [78]. La ausencia de diferencias en la eficiencia de transducción de linfocitos T con el CAR era un objetivo de gran importancia en este trabajo, ya que permite validar las posibles diferencias en su activación y propiedades antitumorales bajo las condiciones de diferenciación a un fenotipo Trm.

### **Evaluación *in vitro* de la activación específica de linfocitos CD8 T-CAR con un fenotipo Trm**

Luego de estandarizar el protocolo de transducción e inducción de fenotipo Trm, se evaluó la capacidad de los linfocitos T-CAR Trm de ser activados por su antígeno específico, en este caso, CEA. La activación *in vitro* de los linfocitos T CD8 incubados previamente con las combinaciones de citoquinas analizadas en el primer

objetivo dio cuenta de una disminución significativa en el porcentaje de linfocitos T-CAR capaces de producir IFN- $\gamma$  de los linfocitos T incubados en presencia de TGF- $\beta$  en comparación e la condición más activa con IL-15 en el medio de cultivo (**Fig. 5A**). Si comparamos la situación control sin citoquinas con las condiciones +TGF- $\beta$  o +IL-15 por sí solas, no existe ninguna variación estadísticamente significativa. En cuanto a su expresión, se observó una tendencia similar, donde la mayor producción es generada por los linfocitos T-CAR diferenciados con IL-15 y disminuyendo estadísticamente en prácticamente todas las condiciones de cultivo restantes, excluyendo aquella donde se combina TGF- $\beta$ +IL-15 (**Fig. 5B**). Respecto a la expresión de TNF- $\alpha$ , no se observó una tendencia clara, (**Fig. 5D**), probablemente porque el tiempo de detección de esta molécula no fue el apropiado, ya que TNF- $\alpha$  se expresa rápidamente luego que un linfocito T es activado [114] y, en nuestro caso, la detección se realizó luego de 20-24 h post-activación. El método de detección utilizado fue tinción intracelular seguido de citometría de flujo; probablemente la realización de un ELISA o un ensayo CBA (del inglés, *Cytometric Bead Array*) del medio de cultivo de estos linfocitos T activados, evaluando la producción y secreción de esta y otras citoquinas, otorgaría más información en cuanto a la activación de los linfocitos T CD8. Por otra parte, si bien existen reportes que sugieren un rol activador del sistema inmune [115], la mayoría de los artículos apoyan la acción de TGF- $\beta$  como una citoquina inmunosupresora [116]. TGF- $\beta$  es una molécula que luego de unirse a su receptor en la membrana de su célula blanco gatilla una cascada de señalización dependiente los factores de transcripción Smad y que modula la respuesta inmune de distintas maneras [117]. Se ha observado una asociación entre la señalización mediada por CD103 y aquella inducida por TGF- $\beta$ , interacción dependiente de la acción del eje proteína kinasa B/AKT y que desencadenaría un aumento en la adhesión y señalización mediada por CD103 y un

aumento en la actividad antitumoral de los linfocitos T [118]. En nuestros experimentos, observamos una disminución clara de la capacidad de los linfocitos T CD8 murinos de ser activados por su antígeno específico (**Fig. 5A-B**). En este caso, esta disminución en la activación de los linfocitos T CD8 probablemente inducida por la acción de TGF- $\beta$  sólo se vio contrarrestada cuando se combinó con IL-15, citoquina importante en la proliferación homeostática y en la activación de linfocitos T CD8. Por este motivo, y teniendo también en consideración un equilibrio con la expresión de los marcadores de Trm, se determinó que la combinación a utilizar para inducir la expresión de un fenotipo Trm en los linfocitos T CD8 murinos, sin afectar en demasía su capacidad de ser activados, fue la mezcla de las citoquinas TGF- $\beta$ +IL-15.

Del mismo modo, se realizaron ensayos de citotoxicidad *in vitro*, lo que nos acerca un poco más a un contexto fisiológico de activación de linfocitos T CD8, ya que el antígeno específico es expresado directamente por una célula tumoral, y no está inmovilizado de manera artificial a una placa de cultivo. Para evaluar la lisis de las células blanco se utilizó 7-AAD y anexina V mediante citometría de flujo; el primero es un agente intercalante del ADN, el cual sólo es capaz de ingresar al interior de la célula cuando ésta ha perdido permeabilidad en su membrana, tanto celular como nuclear, por lo que se une al material genético, y el segundo es una molécula que se une al fosfolípido de membrana fosfatidilserina, el cual, en una célula viva, está presente en la membrana interna de la bicapa lipídica y que es expuesto a la cara externa cuando la célula ha entrado en proceso de apoptosis. De esta manera, cuando una célula está muerta o necrótica será 7-AAD+ y anexina V+, mientras que una célula apoptótica será anexina V+ pero 7-AAD- (**Fig. 6A-B**). Nuestros resultados muestran que tanto los linfocitos T OT-I efectores clásicos, es decir,

incubados en presencia de IL-2+IL-15, como los OT-I Trm, diferenciados en presencia de TGF- $\beta$ +IL-15 son capaces de lisar específicamente las células tumorales blanco B16F10-OVA+; células control que no expresan OVA no son lisadas por estos linfocitos (**Fig. 5C**). Sin embargo, a una relación efector:blanco igual a 10, se observó que la lisis de células blanco mediada por los linfocitos T OT-I fue estadísticamente mayor en comparación a aquella mediada por los linfocitos T OT-I Trm, diferencia que no existe al aumentar esta relación a 20 (**Fig. 6C**). Esto puede sugerir, como se observó en los ensayos de activación *in vitro*, que los linfocitos T incubados o diferenciados con TGF- $\beta$ +IL-15, con el fin de inducir la expresión de marcadores Trm, son un poco menos activos que aquellos incubados en condiciones clásicas, pero, cuando el número de estos aumenta, su capacidad citotóxica es prácticamente igual a la de linfocitos T OT-I clásicamente activados.

Debido a la poca disponibilidad de linfocitos T-CAR, fue necesario cambiar de modelo experimental, de estos linfocitos T, específicos contra un antígeno tumoral como CEA, a un modelo estándar de linfocitos T OT-I específicos contra OVA, cuya ventaja es que todos los linfocitos T CD8 en el modelo murino transgénico OT-I son específicos contra esta proteína. En este contexto, es de esperar que la forma en que un linfocito T-CAR versus un linfocito T OT-I elimina una célula blanco no sea la misma, considerando que un CAR reconoce a su antígeno de manera independiente a la maquinaria de MHC, a diferencia de un linfocito T OT-I cuyo reconocimiento es dependiente de la maquinaria TCR-MHC [119]. Por otro lado, es notoria la necesidad de seguir optimizando esta estrategia para evaluar citotoxicidad *in vitro*, a pesar que varios trabajos han logrado demostrar la equivalencia entre ésta y el ensayo de liberación de cromo como *gold standard* [120,121], nuestros resultados no fueron los esperados; la lisis específica fue relativamente baja sugiriendo la

necesidad de optimizar, ya sea las proporciones de células efector:blanco probadas, y/o la estrategia de análisis de la citometría. Pese a todo, nuestros resultados sugieren que los linfocitos T CD8 murinos cultivados en condiciones de inducir la expresión de marcadores Trm (TGF- $\beta$ +IL-15) son capaces de reconocer su antígeno específico, ser activados, producir moléculas efectoras como IFN- $\gamma$  y eliminar específicamente células tumorales blanco, en un porcentaje similar a linfocitos T CD8 activados y cultivados de manera clásica.

### **Evaluación de la capacidad de los linfocitos T CD8 con un fenotipo Trm de reducir el tamaño de tumores sólidos en modelos murinos *in vivo***

Finalmente, para validar la información obtenida en los ensayos *in vitro*, ensayos de protección tumoral *in vivo* fueron desarrollados en ratones de la cepa C57BL/6. Según la información manejada, aún no existen reportes de la inducción *in vitro* de un fenotipo Trm en linfocitos T CD8 para su utilización en protocolos de transferencia adoptiva. Se pudo observar una tendencia de protección mediada por los linfocitos T transferidos, sin embargo, esta protección no fue estadísticamente significativa. Es necesario remarcar que no se vio diferencia entre el grupo control (PBS) y el grupo inyectado con linfocitos OT-I clásicos de manera i.v. (control positivo), a pesar que la funcionalidad de esta estrategia está ampliamente demostrada. En este caso, la inyección i.t. de linfocitos T específicos, tanto clásicamente diferenciados, como en condiciones Trm, tampoco brindó la protección esperada, pese a que el grupo inyectado i.t. con linfocitos T OT-I Trm fue el que sobrevivió por más tiempo (**Fig. 7B**).

Dado que observamos que la incubación de los linfocitos T CD8 con IL-2 disminuye la expresión de CXCR3 *in vitro*, el cual media la migración de los linfocitos antitumorales hacia el tumor, se evaluó la contribución de IL-2 en los ensayos de protección antitumoral. Como se mencionó, IL-2 es ampliamente utilizada en protocolos de expansión *ex vivo* de linfocitos T para ser transferidos a pacientes con cáncer, incluso en concentraciones tan altas como 1000 UI/mL o utilizándose como proteína recombinante. Es de imaginar que, si esta aproximación tiene buenos resultados, incluso disminuyendo CXCR3, nuestra estrategia de diferenciación de linfocitos T hacia un fenotipo Trm, en donde la expresión de este receptor se mantiene alta podría brindar mejores resultados. Sin embargo, en este experimento, ni los linfocitos T clásicamente activados, ni los linfocitos T con fenotipo Trm pudieron retardar el crecimiento tumoral ni proteger a los ratones, por lo que el aporte de CXCR3 en el efecto de la terapia no pudo ser evaluado (**Fig. 7C**). Existen muchas formas de mejorar conceptualmente los experimentos realizados, por ejemplo, aumentar la dosis de los linfocitos OT-I transferidos o la inyección sistémica de drogas que se utilicen contra el cáncer colorrectal como 5-fluorouracilo, la coadministración de IL-2 que impida la carencia de citoquinas en la circulación o la utilización de modelos inmunodeprimidos donde los únicos componentes inmunes sean las células transferidas.

Se ha registrado que los linfocitos Trm expresan la molécula PD-1 en su superficie, la cual normalmente es asociada con el agotamiento de los linfocitos y con supresión de la respuesta inmune. Si esta molécula fuera expresada debido a nuestro protocolo, la estrategia pudo verse complementada con el uso de anticuerpo monoclonales anti-PD-1, el cual está aprobado por la FDA para su uso en humanos. De manera similar, se sabe que la exposición de linfocitos T a TGF- $\beta$  provoca que

estos se diferencien a Tregs, al menos en linfocitos T CD4, los cuales son capaces de producir IL-10 e inhibir la respuesta inmune. Pese a esto, y ya que hay reportes de la existencia de linfocitos T CD8 reguladores, es necesario tener en consideración esta hipótesis o alguna variante, como la posibilidad que la incubación con esta citoquina provoque que los linfocitos T generados sean más propensos a tener características reguladoras.

Finalmente, luego de este trabajo de tesis surgen muchas preguntas acerca del contexto de diferenciación y de cómo funcionan los linfocitos Trm; por ejemplo, si bien nuestra estrategia de cultivo indujo la expresión de marcadores de superficie de Trm como CD69 y CD103, la expresión de otras moléculas importantes en su desarrollo, generación o caracterización como aumento de PD-1 o la disminución de la expresión de S1Pr1 o KLF2 no fue evaluada. Es probable que nuestra estrategia genere una población de linfocitos T CD8 que expresen estos marcadores, pero, que en los tiempos de cultivo evaluados no podamos hablar de linfocitos Trm propiamente tal, los cuales se caracterizan por una firma transcripcional mucho más compleja que la expresión de dos o tres marcadores de superficie [78,76]. Recientemente, se ha demostrado que existen distintas subpoblaciones de Trm con características y requerimientos únicos en cuanto a mantenimiento, necesidad de citoquinas y proliferación homeostática [122]. Es probable que no sea suficiente la incubación con TGF- $\beta$ +IL-15 para generar una población de linfocitos T con características de Trm, quizás el aporte de otras citoquinas como TNF- $\alpha$  o IL-33, evaluadas en este trabajo sí sean importantes, más allá de la capacidad de los linfocitos de ser activados. Por otro lado, el estudio de los linfocitos T-CAR en el tratamiento de tumores sólidos avanza rápidamente, no solo por el mayor número de ensayos clínicos que se están realizando en la materia, sino también al mayor

conocimiento en cuanto a cuál subpoblación de linfocitos es la mejor para ser modificados y transferidos. En este aspecto, lograr la diferenciación y generación efectiva de linfocitos Trm *ex vivo* capaces de permanecer en el tumor por largos periodos, y redirigir la respuesta mediante la expresión estable de un CAR sigue pareciendo una estrategia interesante para el tratamiento contra el cáncer y otras enfermedades.





## BIBLIOGRAFIA

- [1] World Health Organization. Descriptive note N°297; 2015
- [2] Globocan, 2012<sup>a</sup>
- [3] Mathers C., y Loncar D., 2006
- [4] DEIS. MINSAL; 2014
- [5] American Cancer Society, 2010
- [6] Itriago L. y col., Epidemiology of cancer in Chile and worldwide: present and future. 2013
- [7] Rahma O., y Khleif S., Therapeutic vaccines for gastrointestinal cancers. 2011
- [8] Sabah M. y col., Gastrointestinal stromal tumours: An update. 2005
- [9] Amedei A. y col., Novel immunotherapeutic strategies of gastric cancer treatment. 2011
- [10] National Cancer Institute, 2012
- [11] Purtilo D. y col., Defective immune surveillance in viral carcinogenesis. 1984
- [12] Beutler B., A., TLRs and innate immunity. 2009
- [13] Shortman K. y Heath W., The CD8+ dendritic cell subset. 2010
- [14] Murali-Krishna K. y col., Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. 1998
- [15] Zhang N. y Bevan M., CD8+ T cells: foot soldiers of the immune system. 2011
- [16] Mahmoud S. y col., Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. 2011
- [17] Dudley M. y col., Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. 2002
- [18] Dudley M., y Rosenberg A., Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. 2003
- [19] Qian C., y Prieto J., Gene therapy of cancer: induction of anti-tumor immunity. 2004
- [20] Maus M. y col., Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. 2014
- [21] Pule M. y col., Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. 2008
- [22] Fujita Y. y col., Adoptive cellular immunotherapy for viral diseases. 2008
- [23] Yuan J. y col., Integrated NY-ESO-1 antibody and CD8+ T-cell responses correlate with clinical benefit in advanced melanoma patients treated with ipilimumab. 2011
- [24] Kershaw M. y col., A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. 2006
- [25] Duraiswamy J. y col., Therapeutic PD-1 pathway blockade augments with other modalities of immunotherapy T-cell function to prevent immune decline in ovarian cancer. 2013
- [26] Nakajima J. y col., A phase I study of adoptive immunotherapy for recurrent non-small-cell lung cancer patients with autologous  $\gamma\delta$  T cells. 2010
- [27] Zhang Q. y col., Autologous Mouse Prostate Cancer Factor- b-Insensitive CD8+ T Cells: Eradication of Adoptive Transfer of Tumor-Reactive Transforming Growth. 2005
- [28] Zarnitsyna V. y col., Estimating the diversity, completeness, and cross-reactivity of the T cell repertoire. 2013
- [29] Neefjes J. y col., Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. 2011
- [30] Schumacher T., y Schreiber R., Neoantigens in cancer immunotherapy. 2015
- [31] Gros A. y col., PD-1 identifies the patient-specific CD8+ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. 2014
- [32] Gubin M y col., Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. 2014
- [33] Rizvi N. y col., Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. 2015
- [34] Blankenstein T. y col., Targeting cancer-specific mutations by T cell receptor gene therapy. 2015

- [35] Suerth J. y col., Genetic modification of lymphocytes by retrovirus-based vectors. 2012
- [36] Recchia A. y col., Retroviral vector integration deregulates gene expression but has no consequence on the biology and function of transplanted T cells. 2006
- [37] Biasco L. y col., Integration profile of retroviral vector in gene therapy treated patients is cell-specific according to gene expression and chromatin conformation of target cell. 2011
- [38] Cattoglio C. y col., High-definition mapping of retroviral integration sites defines the fate of allogeneic T cells after donor lymphocyte infusion. 2010
- [39] Scholler J. y col., Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. 2012
- [40] Park T. y col., Treating cancer with genetically engineered T cells. 2011
- [41] Morgan R. y col., Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. 2006
- [42] Rapoport A. y col., NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. 2015
- [43] Fehlker M. y col., Concerted down-regulation of immune-system related genes predicts metastasis in colorectal carcinoma. 2014
- [44] Bendle G. y col., Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy. 2010
- [45] Cartellieri M. y col., Chimeric antigen receptor-engineered T cells for immunotherapy of cancer. 2010
- [46] Davenport A.J. y col., CAR-T cells inflict sequential killing of multiple tumor target cells. 2015
- [47] Jackson H.J. y col., Driving CAR T-cells forward. 2016
- [48] Kalos M. y col., T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. 2011
- [49] Till B. y col., Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. 2008
- [50] Park J. y col., Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. 2007
- [51] Kochenderfer J. y col., Adoptive transfer of syngeneic T cells transduced with a chimeric antigen receptor that recognizes murine CD19 can eradicate lymphoma and normal B cells. 2010
- [52] Maus M. y col., Antibody-modified T cells; CARs take the front seat for hematologic malignancies. 2014
- [53] Nagorsen D. y col., Clinical and immunologic responses to active specific cancer vaccines in human colorectal cancer. 2006
- [54] Rao B. y col., Clinical outcomes of active specific immunotherapy in advanced colorectal cancer and suspected minimal residual colorectal cancer: a meta-analysis and system review. 2011
- [55] Schlimper C. y col., Improved activation toward primary colorectal cancer cells by antigen-specific targeting autologous cytokine-induced killer cells. 2012
- [56] Tsouma A. y col., Multiplex RT-PCR-based detections of CEA, CK20 and EGFR in colorectal cancer patients. 2010
- [57] Roa I. y col., Gallbladder cancer: immunohistochemical expression of CA-19-9, epithelial membrane antigen, dupan-2 and carcinoembryonic antigen. 1992
- [58] Ricci-Vitiani L. y col., Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. 2007
- [59] O'Brian C. y col., A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. 2007
- [60] Cheever M. y col., The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. 2009
- [61] Bannura G. y col., Antígeno carcinoembrionario preoperatorio como factor pronóstico independiente en cáncer de colon y recto. 2004
- [62] Katz S.C. y col., Phase I Hepatic Immunotherapy for Metastases Study of Intra-Arterial Chimeric Antigen Receptor-Modified T-cell Therapy for CEA+ Liver Metastases. 2015
- [63] Kalos M. y June C., Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology. 2013

- [64] Caruana I. y col., Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirected T lymphocytes. 2015
- [65] Colonna M. y col., Dendritic cells at the host-pathogen interface. 2006
- [66] Kolumam G. y col., Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. 2005
- [67] Marshall H., y Kaech S., Regulating the diverse outcomes of interferon's interference. 2013
- [68] Sallusto F. y col., Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. 2004
- [69] Sallusto F. y col., Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. 1999
- [70] Klebanoff C. y col., Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. 2005
- [71] Ariotti S. y col., Skin-resident memory CD8+ T cells trigger a state of tissue-wide pathogen alert. 2014
- [72] Schenkel J. y col., Tissue-resident memory T cells. 2014
- [73] Steinert E. y col., Quantifying memory CD8 T cells reveals regionalization of immunosurveillance. 2015
- [74] Liu L. y col., Dynamic programming of CD8+ T cell trafficking after live viral immunization. 2006
- [75] Groom J. y Luster A., CXCR3 in T cell function. 2011
- [76] Mackay L. y col., The developmental pathway for CD103+CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. 2013
- [77] Wakim L. y col., The molecular signature of tissue resident memory CD8 T cells isolated from the brain. 2012
- [78] Casey K. y col., Antigen-independent differentiation and maintenance of effector-like Trm cells in tissues. 2012
- [79] Ariotti S. y col., Trm CD8+ cells continuously patrol skin epithelia to quickly recognize local antigen. 2012
- [80] Bergsbaken T. y Bevan M., Proinflammatory microenvironments within the intestine regulate the differentiation of tissue-resident CD8+ T cells responding to infection. 2015
- [81] Balkwill F., The chemokine system and cancer. 2012
- [82] Hu J.K. y col., Expression of chemokine receptor CXCR3 on T cells affects the balance between effector and memory CD8 T-cell generation. 2011
- [83] Skon C. y col., Transcriptional downregulation of S1Pr1 is required for establishment of resident memory CD8 T cells. 2013
- [84] Webb J. y col., CD103 demarcates intraepithelial, prognostically favorable CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. 2014
- [85] Gofu G. y col., Role of  $\beta 7$  integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. 2009
- [86] Cerf-Bensussan N. y col., A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes. 1987
- [87] Le Floch A. y col.,  $\alpha E\beta 7$  integrin interaction with E-cadherin promotes antitumor CTL activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis. 2007
- [88] Franciszkiwicz K. y col., CD103 or LFA-1 engagement at the immune synapse between cytotoxic T cells and tumor cells promotes maturation and regulates T-cell effector functions. 2012
- [89] Le Floch A. y col., Minimal engagement of CD103 on CTL with an E-cadherin-Fc molecule triggers lytic granule polarization via a PLC $\gamma$ -dependent pathway. 2011
- [90] Park S. y col., Distinct recirculation potential of CD69+ CD103- and CD103+ thymic memory CD8+ T cells. 2016
- [91] Mackay L. y col., T-box transcription factors combine with the cytokines TGF- $\beta$  and IL-15 to control tissue resident memory cell fate. 2015
- [92] Mackay L. y col., Hobit and Blimp1 instruct a universal transcriptional program of tissue residency in lymphocytes. 2016
- [93] Laidlaw B. y col., CD4+ T Cell Help Guides Formation of CD103+ Lung-Resident Memory CD8+ T Cells during Influenza Viral Infection. 2014
- [94] Matsuda J. y col., Temporal dissection of T-bet functions. 2007

- [95] Zhang N., y Bevan M., TGF- $\beta$  signaling controls the formation and maintenance of gut-resident memory T cells by regulating migration and retention. 2013
- [96] Masopust D. y col., Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. 2010
- [97] Gebhardt T., y Carbone F., Immunology: A helpers' guide to infection. 2009
- [98] Jiang X. y col., Skin infection generates non-migratory memory CD8<sup>+</sup> TRM cells providing global skin immunity. 2012
- [99] Djenidi F. y col., CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> tumor infiltrating lymphocytes are tumor-specific tissue resident memory T cells and prognosis factor for survival in lung cancer patients. 2015
- [100] Mackay L. y col., Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T cells in the absence of persisting local antigen presentation. 2012
- [101] Wang B. y col., CD103<sup>+</sup> tumor infiltrating lymphocytes predict a favorable prognosis in urothelial cell carcinoma of the bladder. 2015
- [102] Workel H. y col., CD103 defines intraepithelial CD8<sup>+</sup> PD1<sup>+</sup> tumour-infiltrating lymphocytes of prognostic significance in endometrial adenocarcinoma. 2016
- [103] Mecher M. y col., Signals required for programming effector and memory development by CD8<sup>+</sup> T cells. 2006
- [104] Mikucki M. y col., Non-redundant requirement for CXCR3 signalling during tumoricidal T-cell trafficking across tumour vascular checkpoints. 2015
- [105] Mohan K. y col., CXCR3 is required for migration to dermal inflammation by normal and in vivo activated T cells: differential requirements by CD4 and CD8 memory subsets. 2005
- [106] Turtle C. y Riddell S., Genetically retargeting CD8<sup>+</sup> lymphocyte subsets for cancer immunotherapy. 2011
- [107] Jensen M. y Riddell S., Designing chimeric antigen receptors to effectively and safely target tumors. 2015
- [108] Loetscher M. y col., Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. 1998
- [109] Zhang B. y col., TNF- $\alpha$ -dependent regulation of CXCR3 expression modulates neuronal survival during West Nile virus encephalitis. 2010
- [110] Wennerberg E. y col., CXCL10-induced migration of adoptively transferred human natural killer cells toward solid tumors causes regression of tumor growth in vivo. 2015
- [111] Gattinoni y col., Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells. 2005
- [112] Montes M. y col., Optimum in vitro expansion of human antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells for adoptive transfer therapy. 2005
- [113] Inaguma Y. y col., Construction and molecular characterization of a T-cell receptor-like antibody and CAR-T cells specific for minor histocompatibility antigen HA-1H. 2014
- [114] Zimmerman M. y col., IFN- $\gamma$  upregulates survivin and Ifi202 expression to induce survival and proliferation of tumor-specific T cells. 2010
- [115] Cerwenka A. y col., TGF- $\beta$  1 is a potent inducer of human effector T cells. 1994
- [116] Tu E. y col., TGF- $\beta$  in T cell biology and tumor immunity; angel or devil. 2014
- [117] Travis M. y Sheppard D., TGF- $\beta$  activation and function in immunity. 2014
- [118] Boutet y col., TGF $\beta$  signaling intersects with CD103 integrin signaling to promote T-lymphocyte accumulation and antitumor activity in the lung tumor microenvironment. 2016
- [119] Barret D. y col., Chimeric Antigen Receptor–and TCR-Modified T Cells Enter Main Street and Wall Street. 2015
- [120] Derby E. y col., Three-color flow cytometric assay for the study of the mechanisms of cell-mediated cytotoxicity. 2001
- [121] Lecoer H. y col., A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. 2001

[122] Schenkel J. y col., IL-15-independent maintenance of tissue-resident and boosted effector memory CD8 T cells. 2016

