

Universidad de la República

Facultad de Ciencias

PEDECIBA Biología

TESIS DE MAESTRÍA

Opción Biología Molecular y Celular

“Caracterización de nuevos blancos
moleculares para modular la respuesta inmune
anti-tumoral”

Lic. Sofía Russo Rossi

Orientador: Dr. Marcelo Hill

Co-Orientador: Dr. Eduardo Osinaga

Laboratorio de Inmunoregulación e Inflamación. Institut Pasteur de Montevideo
Departamento de Inmunobiología. Facultad de Medicina. Universidad de la República

Agradecimientos

A Marcelo, por su rol fundamental a mi formación, las discusiones siempre motivantes, y por darme la oportunidad de realizar este trabajo.

A Eduardo, por su contribución a mi formación desde las etapas más tempranas.

A Alejandro Chabalgoity, Álvaro Díaz y Otto Pritsch por aceptar formar parte del tribunal de esta tesis de Maestría.

A Mercedes, por su aporte invaluable al desarrollo de este trabajo, y apoyo en el día a día del laboratorio.

Al resto del LIRI: Florencia, Mathías, Maite, Mariana y María Eugenia, es un gusto trabajar junto a ustedes.

A los compañeros del Dpto. de Inmunobiología, por generar un ambiente estimulante para discutir sobre ciencia y otras cosas.

A los integrantes del Dpto. de Neurofisiología Celular y Molecular (IIBCE) por la gran ayuda brindada en los estudios de electrofisiología.

A los integrantes de la Unidad de Biología Celular, especialmente Sabina, por su colaboración en los experimentos de citometría de flujo.

A los integrantes de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación, por el cuidado brindado a los ratones.

A Cristina Cuturi, Ignacio Anegón y al resto de los integrantes de la unidad INSERM UMR1064 (especialmente a Laurence, Emmanuel y Laura) por su ayuda durante mi estadía en Nantes.

A la ANII por el apoyo económico.

A las Momas, por aguantar los momentos de catarsis y darme siempre para adelante.

A los Rejas, Maru y Tati, por estar siempre y ser un gran apoyo.

A Andrés, por bancarme en estos últimos meses de locura...

Last but not least, a mi familia, por el apoyo incondicional que me dieron toda la vida, sin ustedes no lo hubiera logrado.

Contenido

Resumen	3
Introducción	4
Biología del cáncer	4
Microambiente tumoral	7
Inmunidad y Cáncer.....	9
Inflamasoma en cáncer	20
Inmunoterapias contra el cáncer.....	24
Tmem176B y Tmem176A	30
Objetivos	34
Objetivos específicos.....	34
Materiales y Métodos	35
Resultados.....	45
I. Estudio del desarrollo tumoral en ratones Tmem176B ^{+/+} y Tmem176B ^{-/-}	45
II. Caracterización de la respuesta inmune anti-tumoral en ratones Tmem176B ^{+/+} y Tmem176B ^{-/-}	46
III. Caracterización electrofisiológica de Tmem176B y Tmem176A	59
IV. Estudio de canales iónicos en la activación del inflamasoma NLRP3	62
Discusión	68
Conclusiones y Perspectivas.....	79
Referencias.....	80

Resumen

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo occidental, precedido únicamente por las enfermedades cardiovasculares. Mecanismos mediados por el sistema inmune pueden llevar al reconocimiento específico y muerte de células malignas. Sin embargo, los tumores evitan su destrucción por el sistema inmune al inducir un microambiente inmunorregulador que favorece la emergencia de variantes celulares malignas resistentes al control inmunológico. El estudio de moléculas reguladoras del sistema inmune puede abrir la puerta a nuevas inmunoterapias contra el cáncer.

El objetivo de esta tesis de Maestría fue el estudio de una nueva molécula vinculada a la regulación de la respuesta inmune, Tmem176B (TORID), en el cáncer. Anteriormente, nuestro grupo mostró que, en un modelo de trasplante, Tmem176B promovía el procesamiento de antígenos del órgano trasplantado a través de la presentación cruzada en BMDC tolerógenas *in vivo*. Esta presentación cruzada dependiente de Tmem176B conducía a la generación de células Treg específicas de los antígenos del donante en el ganglio que drena el órgano trasplantado. Por otro lado, también se mostró que Tmem176B es un canal/transportador iónico, que en la membrana de fagosomas regula el pasaje de cationes lo que impacta directamente en la actividad V-ATPasa y de esa manera en el pH fagosomal.

En este trabajo se vio que ratones deficientes en Tmem176B presentaban un crecimiento tumoral más lento y una mejor sobrevida que los ratones “wild type” cuando se les inyectaba células tumorales. El estudio de los mecanismos involucrados en esta diferencia reveló que, en el ganglio drenante del tumor, los ratones “knock-out” para TORID tenían una menor expresión en moléculas relacionadas a la regulación de la respuesta inmune (FoxP3, CTLA-4, CCL22). A nivel del microambiente tumoral vimos que los ratones TORID KO presentaban una mayor cantidad de células T CD8⁺ y células T CD8⁺ específicas del tumor que los ratones WT. A su vez, el ratio T CD8⁺/T CD4⁺FoxP3⁺ estaba aumentado en los ratones TORID KO. También observamos una tendencia de aumento en la cantidad de células T CD4⁺RORyt⁺ en los ratones TORID KO. Esto se podría explicar por el aumento en la activación del inflammasoma NLRP3 que observamos *in vivo* en los ratones TORID KO. Por lo tanto, en los ratones TORID KO hay un aumento en mecanismos efectores de la inmunidad que explicarían las diferencias observadas en el crecimiento tumoral y la sobrevida entre ratones con cáncer WT y TORID KO.

Mediante registros de “whole cell patch clamp” en células CHO transfectadas con Tmem176B y Tmem176A encontramos resultados en línea con estudios previos realizados en ovocitos de *Xenopus*. Confirmamos que estas proteínas se comportan como un canal sensible al ácido (pH 5), generando una corriente con un potencial de reversión cercano a -20 mV, lo que correspondería a un canal catiónico no selectivo.

En conclusión, nuestros resultados muestran que TORID promovería el desarrollo tumoral a través de la disminución de mecanismos efectores de la inmunidad. Por su rol como canal iónico modularía la activación del inflammasoma NLRP3, de esta forma teniendo efecto inhibitorio sobre las respuestas inmunes anti-tumorales. Esto abre como perspectiva la utilización de inhibidores de TORID como una nueva inmunoterapia anti-tumoral.

Introducción

Biología del cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo occidental, precedido únicamente por las enfermedades cardiovasculares. Uruguay no es una excepción; en nuestro país el cáncer también es la segunda causa de muerte con una incidencia global de 251,1 casos nuevos por año cada 100.000 personas (cociente estandarizado por edad) y una mortalidad de 144,8 muertes por año cada 100.000 personas (cociente estandarizado por edad) (Figura 1)(Globocan 2012).

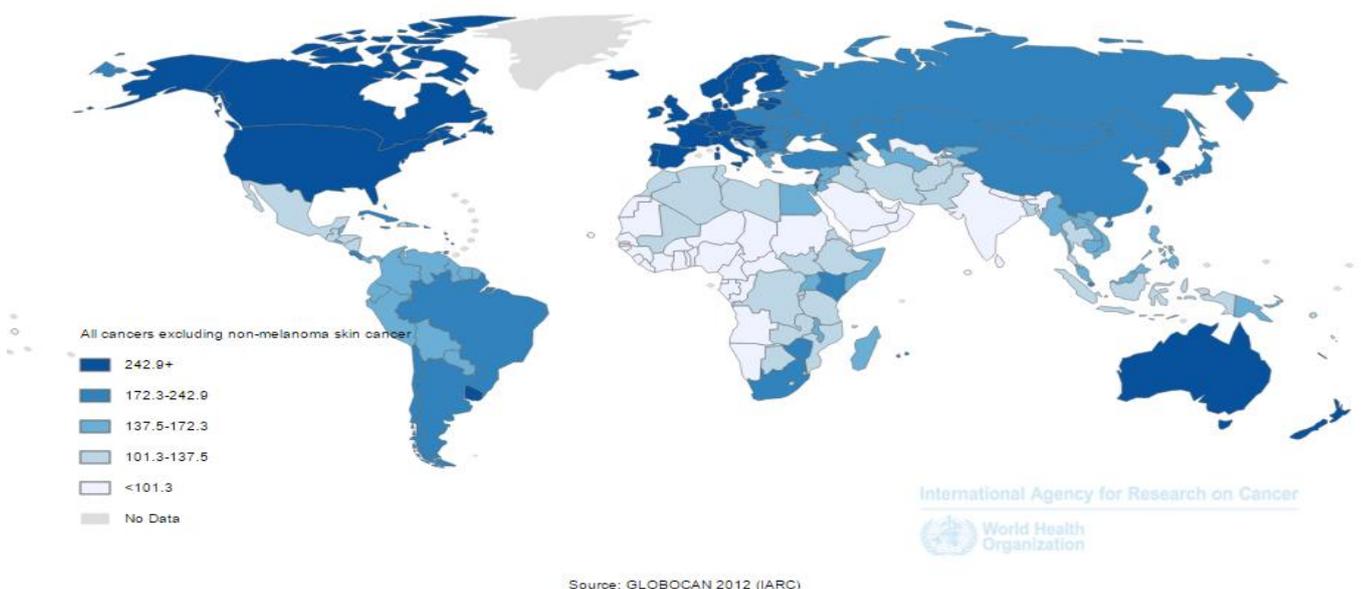


Figura 1. Incidencia mundial de cáncer. En el mapa se muestra la incidencia de cáncer, excluyendo el cáncer de piel no-melanoma, en cada país. Particularmente en nuestro país la incidencia de cáncer es de 251,1 casos nuevos por año cada 100.000 personas. *Datos obtenidos del proyecto GLOBOCAN 2012.*

El cáncer presenta características distintivas que son adquiridas de forma secuencial en el desarrollo del mismo (Hanahan & Weinberg 2000). Una de las características distintivas de las células tumorales es su capacidad de mantener una proliferación crónica. Las células normales controlan de forma estricta la liberación de señales de crecimiento de forma de asegurar la homeostasis del número celular, y por lo tanto del mantenimiento de la

arquitectura y función normal de tejidos (Hanahan & Weinberg 2011). En cambio las células tumorales, al desregular estas señales pueden proliferar de forma descontrolada. Las células tumorales pueden adquirir la capacidad de mantener señales proliferativas de varias maneras. Pueden ellas mismas producir factores de crecimiento, o estimular a células normales dentro del estroma tumoral a producir varios factores de crecimiento. A su vez, también pueden elevar la expresión de receptores de factores de crecimiento en la superficie celular, haciendo que respondan más fuertemente a cantidades limitadas de ligandos (Hanahan & Weinberg 2011). Además de mantener señales proliferativas, las células tumorales deben de evadir mecanismos supresores del crecimiento celular. Las células tumorales presentan deficiencias en moléculas supresoras tumorales, así como falta de inhibición por contacto célula-célula.

Otra característica distintiva de las células tumorales es su capacidad de resistir la muerte celular. Las células tumorales presentan diferentes estrategias para evitar la muerte por apoptosis. La estrategia más común es la pérdida de la función del supresor tumoral TP53, de esta forma se pierde un sensor de daño crítico del circuito de inducción de la apoptosis. En otros casos, las células tumorales pueden aumentar la expresión de reguladores anti-apoptóticos como Bcl-2, o disminuir la expresión de reguladores pro-apoptóticos como Bax y Bim (Hanahan & Weinberg 2011).

Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren del suministro de nutrientes y oxígeno, así como eliminar sus desechos metabólicos y dióxido de carbono. Esto es permitido por la nueva vasculatura que se forma en el proceso de angiogénesis. Durante la progresión tumoral se da un cambio hacia programas de angiogénesis, provocando que de la vasculatura quiescente normal broten nuevos vasos que ayudan a mantener el crecimiento tumoral. Algunas células tumorales pueden intravasarse a vasos sanguíneos o linfáticos próximos al tumor, luego son transportadas a través del sistema hematológico y linfático. Estas células tumorales pueden luego escapar del vaso sanguíneo y extravasarse al parénquima de tejidos

distantes. Allí generan pequeños nódulos de células tumorales que pueden crecer hasta formar tumores macroscópicos. Este proceso, conocido como metástasis, constituye otra característica distintiva del cáncer (Hanahan & Weinberg 2011).

La transformación celular puede ser causada tanto por factores externos como por factores internos. Dentro de los factores externos se encuentran organismos infecciosos como los virus, como algunos subtipos de HPV, hepatitis B y C y el virus de Epstein-Barr (Martin & Gutkind 2008; McLaughlin-Drubin & Munger 2008). Otros organismos como las bacterias, entre ellas *Helicobacter pylori*, y helmintos como *Schistosoma haematobium* (Abdel Mohsen et al. 2000) también son agentes carcinogénicos humanos. Se estima que un 16% de los casos de cáncer son causados por agentes patógenos (Pisani et al. 1997). Los posibles mecanismos por los que ciertos parásitos inducirían cáncer incluyen el establecimiento de inflamación crónica (Grivennikov et al. 2010), la modulación del sistema inmunitario del hospedero, la alteración de vías de regulación de la proliferación, la inducción de inestabilidad genómica y la inhibición de la comunicación intracelular (Herrera et al. 2005). También se encuentran dentro de los factores externos la dieta, el tabaco, químicos carcinogénicos, radiación UV, etc. (Peto 2001).

Dentro de los factores carcinogénicos intrínsecos, se encuentran entre otras las mutaciones heredadas, ciertas influencias hormonales y la condición inmunológica. Diversos estudios han revelado que la incidencia del cáncer de mama es incrementada por el embarazo y cuando son administrados estrógenos de forma oral, mientras que disminuye en casos de menarca tardía, menopausia temprana y alta cantidad de partos; evidenciando la influencia hormonal en este tipo de cáncer (Peto 2001).

Los polimorfismos en oncogenes o en genes supresores de tumor pueden provocar un moderado aumento en el riesgo de desarrollar cáncer. Un ejemplo de esto es el polimorfismo de un único nucleótido (SNP, single nucleotide polymorphism) I1307K, en el gen APC, que casi duplica el riesgo de desarrollar cáncer de colon en los individuos que lo presentan (Peto 2001).

Además de evadir supresores del crecimiento, resistir la muerte celular, inducir angiogénesis, proliferar descontroladamente y realizar metástasis las células tumorales desarrollan mecanismos para evadir el ataque por el sistema inmune (Hanahan & Weinberg 2011).

Todas las características distintivas del cáncer se dan como consecuencia de la inestabilidad genómica de las células tumorales, la cual genera mutaciones aleatorias incluyendo re-arreglos cromosómicos, y del estado inflamatorio de lesiones pre-malignas y malignas generado por células del sistema inmune, algunas de las cuales ayudan a promover la progresión tumoral de varias maneras. La inflamación puede contribuir a la adquisición de características distintivas al proveer de moléculas bioactivas al microambiente tumoral, incluyendo factores de crecimiento, factores de supervivencia, factores pro-angiogénicos, y enzimas que modifican la matriz extracelular de forma de facilitar la angiogénesis, invasión y metástasis. Además las células inflamatorias pueden liberar productos químicos, como especies reactivas del oxígeno, que son mutagénicos para las células tumorales vecinas, acelerando su evolución genética hacia estados altamente malignos (Hanahan & Weinberg 2011).

Actualmente es aceptado que la biología tumoral no puede ser comprendida únicamente por las características de las células tumorales, sino que se debe tener en cuenta la contribución del microambiente tumoral en la tumorigénesis.

Microambiente tumoral

En los últimos años se ha reconocido a los tumores como órganos. La biología tumoral puede ser comprendida sólo si se estudian los tipos celulares que se encuentran en el tumor y el microambiente tumoral, que generan estas células durante la tumorigénesis. El microambiente tumoral es un ecosistema funcional de elementos tumorales y estromales que interactúan a través de moléculas señalizadoras (Bhome et al. 2015). El microambiente

tumoral está compuesto por una compleja red que incluye células estromales multipotentes, células madres estromales, fibroblastos, vasos sanguíneos, precursores de células endoteliales, células inmunes, factores secretados como pueden ser citoquinas, así como las células tumorales y las células madre tumorales.

Además de la heterogeneidad de las células tumorales, los tumores presentan otro nivel de heterogeneidad, dada por una subclase de células neoplásicas llamadas células madre tumorales. Las células madre tumorales son un constituyente común de la mayoría, si es que no de todos, los tumores. Estas células madre tumorales son definidas por su capacidad de formar eficientemente nuevos tumores cuando son inoculados a otro hospedero (Hanahan & Weinberg 2011).

Las células estromales co-evolucionan con las células tumorales, siendo frecuentemente educadas o modificadas por las células tumorales para sintetizar una variedad de citoquinas, factores de crecimiento y proteasas, lo que acelera dramáticamente la progresión de la enfermedad (Chen et al. 2015).

Los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) son el tipo celular predominante del estroma, y son responsables de la estructura arquitectónica de la matriz extracelular (Bhome et al. 2015). Dado que secretan una variedad de componentes de la matriz extracelular, los fibroblastos asociados al cáncer están implicados en la formación del estroma desmoplástico que caracteriza muchos carcinomas avanzados (Hanahan & Weinberg 2011). Estas células también están jugando un rol importante en la angiogénesis; se ha reportado que la inhibición del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) secretado por los CAF reduce la angiogénesis (Pietras et al. 2008).

La vasculatura estromal está formada por una red capilar de células endoteliales rodeadas de pericitos que proveen de apoyo estructural y fisiológico. En tejidos normales, los pericitos proveen señales parácrinas al endotelio normalmente quiescente. Los pericitos

también colaboran con las células endoteliales para sintetizar la membrana vascular que ancla tanto pericitos y células endoteliales, y ayudan a las paredes vasculares a soportar la presión hidrostática del flujo sanguíneo (Hanahan & Weinberg 2011). Tumores con cobertura pobre de pericitos en su vasculatura serían más propensos a permitir la intravasación de las células tumorales hacia el sistema circulatorio, permitiendo su diseminación. Esto es debido a que presentan uniones estrechas más permeables (Bhome et al. 2015).

La matriz extracelular constituye el andamio celular del microambiente tumoral proporcionando soporte estructural al endotelio tumoral y a las células estromales. Esta matriz es producida por células mesenquimales, incluyendo fibroblastos, condrocitos, y osteoblastos, y consiste en varios componentes incluyendo colágeno, galectinas, proteoglicanos, y glicoproteínas (Bhome et al. 2015). La matriz extracelular provee de un nicho de células madres tumorales y está implicado en la angiogénesis y vías inflamatorias que contribuyen a un microambiente tumoral pro-metastásico (Bhome et al. 2015).

Las células inmunes en el microambiente tumoral tienen tanto efectos anti- como pro-tumorales. Las respuestas producidas por macrófagos M1, células T citotóxicas, células Th1, células presentadoras de antígeno y células NK promueven el rechazo tumoral. Por otro lado, macrófagos M2, células T reguladoras y células Th2 permiten la progresión tumoral (Bhome et al. 2015). La relación entre las células del sistema inmune y el cáncer se desarrollará a continuación.

Inmunidad y Cáncer

En 1909, Paul Ehrlich fue uno de los primeros en proponer el concepto de que el sistema inmune presenta un rol crítico en la protección de un individuo contra el cáncer. Proponía que de otra forma, la incidencia del cáncer sería ampliamente superior (Ehrlich 1909). En la década del '50, Frank MacFarlane Burnet y Lewis Thomas postularon la hipótesis de la inmunovigilancia del cáncer. Estos autores postularon que las células del sistema inmune

pueden detectar y destruir las células tumorales, previniendo la manifestación clínica del tumor. El sistema inmune habría evolucionado, al menos en parte, para controlar el crecimiento desmedido de células malignas (Burnet 1970; Dunn et al. 2002). La participación del sistema inmunológico en la generación de defensas contra el cáncer ha sido evidenciada ampliamente. La mayor incidencia de cáncer en individuos con el sistema inmunitario deprimido es una evidencia fuerte de la existencia de mecanismos inmunológicos antitumorales. Estudios en ratones con diferentes inmunodeficiencias mostraron una mayor susceptibilidad al desarrollo de tumores, tanto espontáneos como inducidos por carcinógenos, que sus contrapartes inmunocompetentes (Dunn et al. 2006). Por otro lado, si se inyectaban ratones con células tumorales irradiadas que no podían crecer, estos ratones generaban protección contra posteriores inyecciones con una dosis normalmente letal de células viables del mismo tumor. Estos efectos protectores no son observados en ratones deficientes de células T, pero pueden ser conferidos por la transferencia de células T de otro ratón, demostrando la necesidad de las células T para mediar todos estos efectos. Estas observaciones indican que los tumores expresan péptidos antigénicos que pueden convertirse en blanco de una respuesta tumor específica mediada por células T. Estos antígenos de rechazo tumoral son expresados por tumores inducidos experimentalmente en roedores, y son usualmente específicos para un tumor individual. Por lo tanto, la inmunización con células tumorales irradiadas de un tumor protege al ratón contra la invasión por células vivas del mismo tumor, pero no tiene efecto contra células pertenecientes a otro tumor (Old & Boyse 1964; Murphy et al. 2008).

El término inmunovigilancia ha evolucionado a un concepto más complejo y amplio, la inmunoedición, introducido por Robert D. Schreiber. La inmunoedición se define por tres eventos claves: eliminación, equilibrio y escape (Dunn et al. 2002; Quezada et al. 2011). La fase de eliminación es la visión contemporánea de la hipótesis original de inmunovigilancia, en donde los sistemas inmunes innato y adaptativo actúan juntos para erradicar el tumor en

desarrollo (Figura 2)(Bhatia& Kumar 2011; Mittal et al. 2014). Aún no se han dilucidado completamente los mecanismos de reconocimiento de las células tumorales, ni cómo es activado el sistema inmune naïve por la transformación. Se cree que la expresión de ligandos inducidos por señales de estrés es uno de los mecanismos gatillados por el ADN dañado que puede alertar a células vecinas de la transformación temprana. Otras señales de peligro, que son liberadas por células recientemente transformadas o por células tumorales moribundas, pueden proveer de señales suficientes para alertar y activar el sistema inmune (Chow et al. 2012). Estas señales de peligro pueden ser reconocidas por células de la inmunidad innata como pueden ser células “natural killer” (células NK), macrófagos, y células T “natural killer” (células NKT). En respuesta a las señales de peligro, las células NK y los macrófagos secretan citoquinas inflamatorias, como por ejemplo interferón gamma (IFN- γ) producida por las células NK, generando mecanismos supresores de tumor. El IFN- γ activa procesos antiproliferativos, proapoptóticos y angiostáticos, que combinados con la acción de otras de las interleuquinas secretadas, llevan a la muerte de un número significativo de células tumorales. Los macrófagos M1 a través de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, como la interleuquina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), inhiben la progresión tumoral (Bhome et al. 2015). A través de la producción de intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno por los macrófagos, y de mecanismos dependientes de perforina mediados por células NK, se da la muerte de células tumorales adicionales. De esta forma se generan antígenos tumorales que pueden ser capturadas por células dendríticas reclutadas en el tumor. Estas células dendríticas que capturaron antígenos tumorales y se activaron, migran al nódulo linfático que drena el tumor y allí activan a células T CD4⁺ y CD8⁺ “naïve”. Las células T CD4⁺ y CD8⁺ tumor específicas migran hacia el tumor para eliminar células tumorales viables que expresan dichos antígenos tumorales (Mittal et al. 2014; Bhatia & Kumar 2011). Una vez que las células T están en el microambiente tumoral, el éxito de su acción antitumoral es determinada por su habilidad de superar barreras adicionales y defensas que encuentran por

parte de las células tumorales, estromales, células T reguladoras, células mieloides supresoras, citoquinas inhibitoras, y otras células en el microambiente tumoral que actúan para mitigar las respuestas inmunes antitumorales (Sharma & Allison 2015). Las células NK y algunas células T, células T $\gamma\delta$, expresan el receptor NKG2D en su superficie. Dicho receptor es un receptor activador, que constituye uno de los receptores principales para el reconocimiento y eliminación de células transformadas (Corthay 2014; Mittal et al. 2014). Los ligandos de NKG2D son proteínas propias que se expresan en bajos niveles en células normales, pero que aumenta su expresión en células estresadas. En humanos los ligandos de NKG2D incluye MICA y MICB. Las células que expresan estos ligandos pueden ser eliminados por células NK y células T $\gamma\delta$ en un proceso llamado vigilancia linfocítica de estrés. Varios estudios sugieren que la expresión de ligandos de NKG2D podría ser directamente inducida por oncogenes. Se ha reportado una correlación entre algunos polimorfismos en NKG2D y la susceptibilidad de desarrollar cáncer de hígado y cervical en humanos, sugiriendo un rol protector de NKG2D contra estas enfermedades (Melum et al. 2008; Chen et al. 2013). La expresión moléculas endógenas inducidas por estrés es usado por el sistema inmune para reconocer y eliminar células pre-malignas (Corthay 2014).

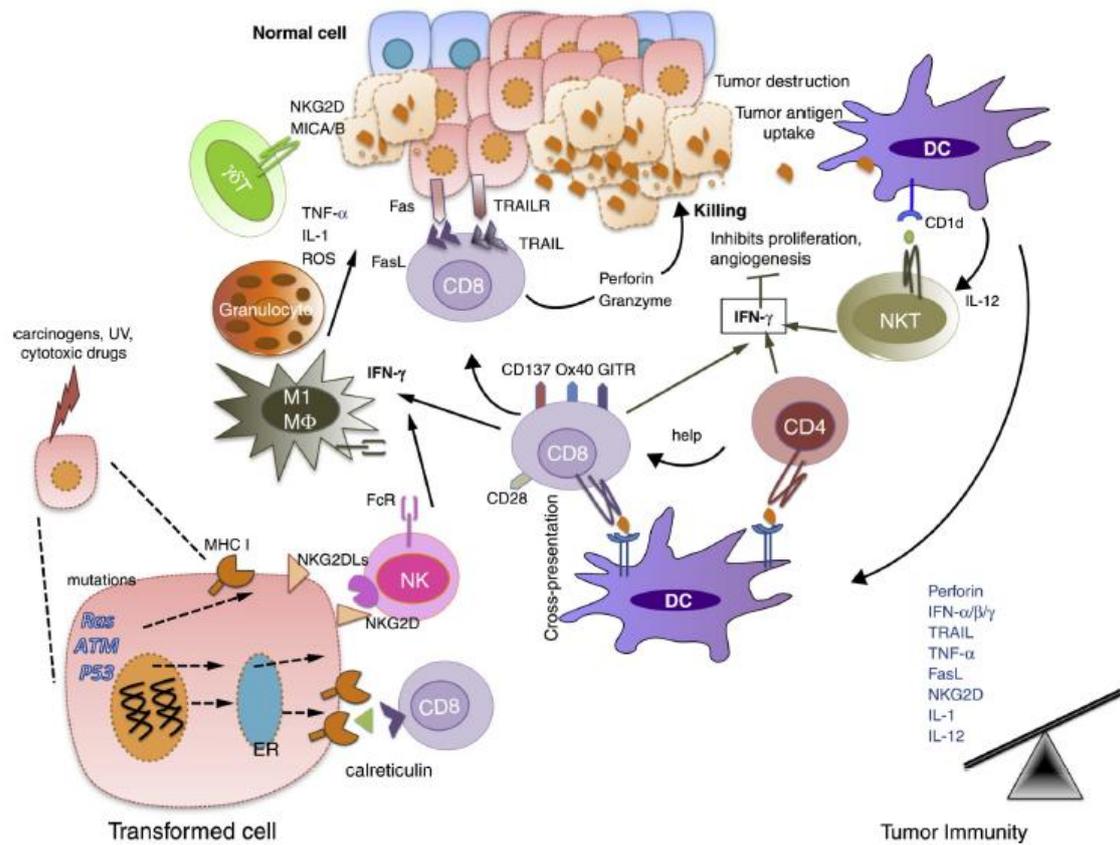


Figura 2. Fase de eliminación de la inmunoección. En la fase de eliminación el sistema innato y adaptativo actúan en conjunto para destruir tumores tempranos. Las células dendríticas pueden tomar antígenos tumorales y presentarlos a células T. Estas células efectoras activadas producen IFN- γ , el cual tiene efectos anti-tumorales al inhibir la proliferación celular y la angiogénesis. Las células tumorales expresan antígenos tumorales en moléculas de MHC-I y/o ligandos de NKG2D que pueden ser reconocidos por células T CD8⁺ y células NK, respectivamente. Células T $\gamma\delta$ también pueden reconocer y eliminar células tumorales que expresen ligandos de NKG2D. Las células T CD8⁺ pueden inducir la apoptosis de las células tumorales a través de la interacción con receptores Fas y TRAIL en células tumorales, o al secretar perforina y granzima. Células de la inmunidad innata, como macrófagos y granulocitos, también participan en la inmunidad anti-tumoral al secretar TNF- α , IL-1, IL-12 y ROS. En esta fase de la inmunoección existe una inclinación hacia la inmunidad anti-tumoral dado por un aumento de expresión de antígenos tumorales, moléculas de MHC-I, receptores Fas y TRAIL en células tumorales, y citoquinas pro-inflamatorias en el microambiente tumoral. *Tomado y modificado de Mittal et al. 2014.*

Si la eliminación no es completamente exitosa, se entra en la fase de equilibrio, en la cual las células tumorales experimentan cambios o mutaciones que ayudan a su supervivencia como resultado de presiones selectivas impuestas por el sistema inmune (Figura 3). Al contrario de las fases de eliminación y escape, que requieren de componentes del sistema inmune innato y adaptativo, la fase de equilibrio es mantenida únicamente por la inmunidad adaptativa (Koebel et al. 2007). Durante este proceso, los linfocitos y el IFN- γ en el tumor

ejercen una potente presión selectiva en las células tumorales, que es capaz de contener el crecimiento tumoral pero no eliminarlo completamente. Los tumores son moldeados por el ambiente inmunológico en el que se forman. Este proceso de moldeado generalmente conduce a la generación de tumores que son capaces de resistir mejor los mecanismos supresores tumorales del sistema inmune (Dunn et al. 2002). Por lo tanto, la intensiva interacción entre las células del sistema inmune y células tumorales, eventualmente induce la aparición de células tumorales con inmunogenicidad reducida. Estas células tumorales con inmunogenicidad reducida, son capaces de sobrevivir en un individuo inmunocompetente. Las alteraciones que deben ocurrir en la remodelación inmunológica del tumor en desarrollo son facilitadas por la inestabilidad genética inherente de las células tumorales (Dunn et al. 2002; Mittal et al. 2014). Como la fase de equilibrio involucra la continua erradicación de las células tumorales, y la continua emergencia de variantes resistentes de células tumorales por la presión selectiva inmune, es posible que la fase de equilibrio sea la más larga de los tres procesos de la inmunoección del cáncer y puede ocurrir por un período de varios años (Chow et al. 2012; Bhatia & Kumar 2011).

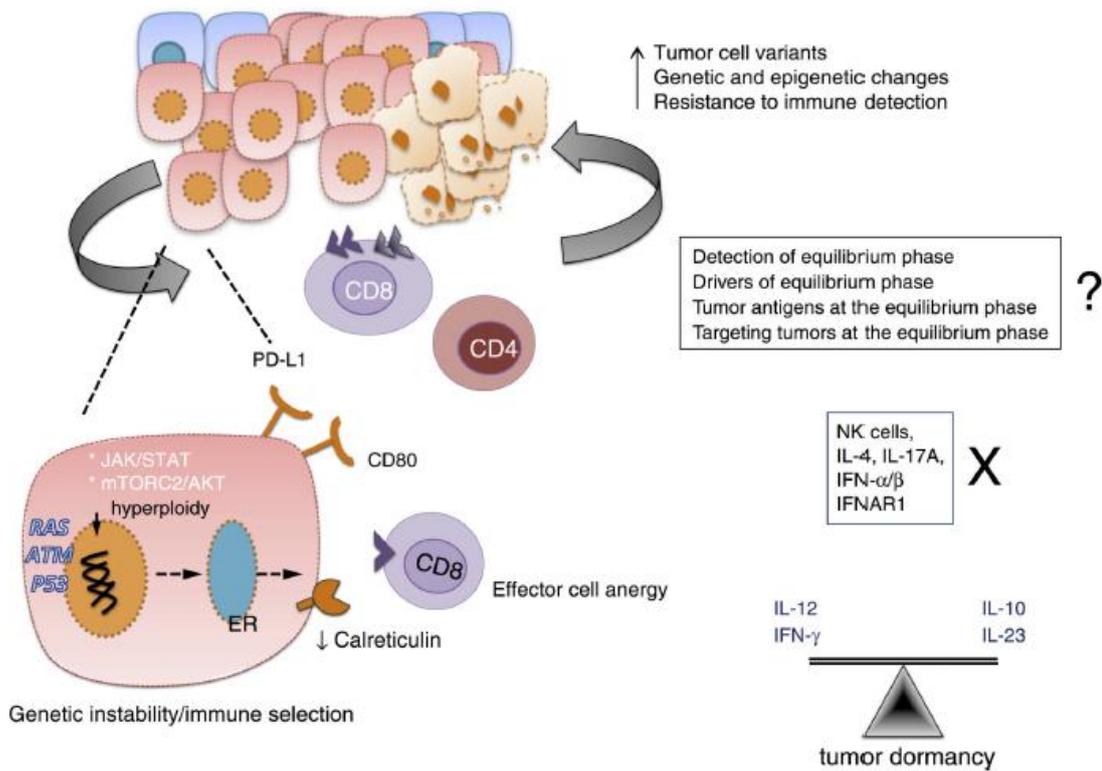


Figura 3. Fase de equilibrio de la inmunoección. En la fase de equilibrio, dada la acción del sistema inmune, el tumor se encuentra en estado de latencia. Existe un equilibrio entre citoquinas anti-tumorales (IL-12, IFN- γ) y pro-tumorales (IL-10, IL-23). Las células tumorales en esta fase sufren cambios genéticos y epigenéticos debido a la presión selectiva impuesta por el sistema inmune adaptativo. Tomado y modificado de Mittal et al. 2014.

Luego de la pérdida de la mayoría de los mecanismos intrínsecos y extrínsecos supresores tumorales, las células tumorales entran en la fase de escape (Figura 4). El escape de las células tumorales puede ocurrir a través de dos grandes cambios que ocurren a nivel de la célula tumoral per se y/o a nivel del microambiente tumoral. La reducción de la inmunogenicidad de las células tumorales puede disminuir el reconocimiento inmune. Además, las células tumorales pueden adquirir resistencia contra las funciones citotóxicas de las células del sistema inmune, como puede ser la expresión de moléculas anti-apoptóticas (bcl2) que impidan la muerte de las células tumorales. A nivel del microambiente tumoral, el escape puede ocurrir por el surgimiento de una red inmunosupresiva. Varios factores producidos por células tumorales y células del sistema inmune, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), la

interleuquina 10 (IL-10) y la prostaglandina E2, contribuyen al establecimiento del microambiente inmunosupresivo (Chow et al. 2012; Bhatia & Kumar 2011). Varias células del microambiente tumoral contribuyen al escape de las células tumorales del sistema inmune. Entre estas se encuentran las células T reguladoras, las células mieloides supresoras, macrófagos asociados al tumor de tipo II y células estromales. Los macrófagos asociados al tumor de tipo II afectan drásticamente la tumorigénesis, angiogénesis, intravasación, y pueden impedir el ataque de las células NK y células T durante el desarrollo tumoral (Chen et al. 2015). Las células tumorales que acumularon suficientes mutaciones para evadir el sistema inmune, pueden crecer sin obstáculos hasta ser clínicamente detectables.

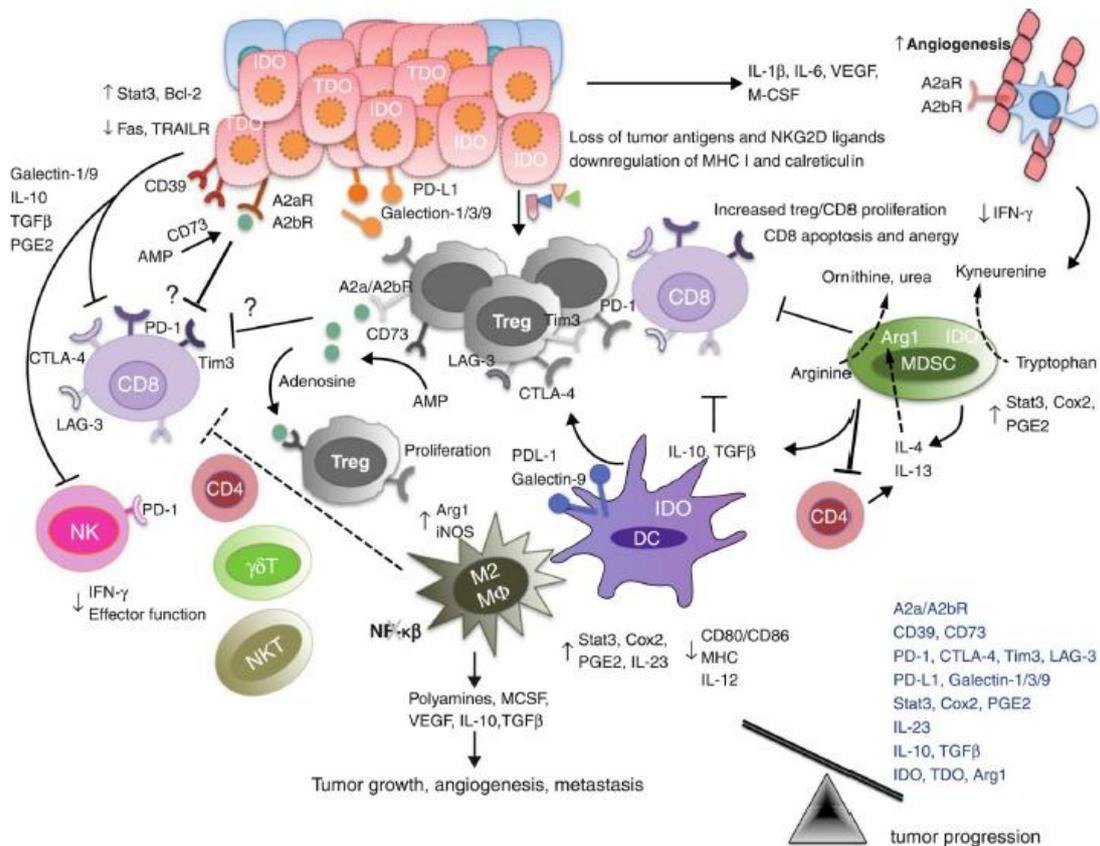


Figura 4. Fase de escape de la inmunodición. En la fase de escape, el sistema inmune falla en controlar el crecimiento tumoral. Las células tumorales evaden su reconocimiento por parte de las células inmunes debido a disminución de antígenos tumorales, moléculas de MHC-I o moléculas coestimuladoras. Además expresan moléculas de aumento de resistencia (STAT-3), de supervivencia (bcl2), moléculas inmunosupresoras (IDO, PD-L1, galectinas, CD39, CD73 y receptores de adenosina) y secretan citoquinas que favorecen la angiogénesis (VEGF, TGF-β, IL-6). Por otro lado, células mieloides supresivas (MDSCs), macrófagos M2 y células dendríticas pueden expresar moléculas inmunoregulatoras como arginasa, iNOS e IDO, y secretar citoquinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF-β. Las MDSCs y DCs que expresan IDO inducen la generación de células T reguladoras. Células T, incluyendo a las células T

reguladoras, expresan receptores inhibitorios como PD-L1, CTLA-4, Tim-3 y LAG3 que inhiben respuestas anti-tumorales favoreciendo el crecimiento tumoral. En esta fase existe una inclinación hacia la progresión tumoral, dada por la presencia de citoquinas y moléculas inmunosupresoras como IL-10, TGF- β , IDO, PD-L1 y CTLA-4. *Tomado y modificado de Mittal et al. 2014.*

Recientemente se ha propuesto que la inestabilidad genómica de las células tumorales no es imperativa para el escape inmune, y en cambio el escape de las células tumorales al sistema inmune puede ser mediado solamente por una competencia por recursos, específicamente glucosa, entre las células tumorales y las células del sistema inmune en el microambiente tumoral (Kareva & Berezovskaya 2015). Kareva y Berezovskaya proponen que al crecer el tumor, las células en el centro del mismo son privadas de oxígeno y son forzadas a cambiar hacia la glicolisis, mientras que las células de la periferia continúan utilizando la fosforilación oxidativa como mecanismo de obtención de energía más eficiente. Si las células aerobias de la periferia del tumor son lo suficientemente inmunogénicas como para iniciar una respuesta inmune fuerte, los linfocitos citotóxicos eliminan estas primeras células, exponiendo el centro de células tumorales glicolíticas. Estas células tumorales que utilizan la glicolisis como mecanismo de obtención de energía pueden competir con las células inmunes por la glucosa. Las células inmunes pierden su capacidad de ejercer su función en condiciones de privación de nutrientes, por lo tanto las células tumorales glicolíticas pueden dificultar la actividad de las células inmunes solamente al competir por la glucosa, permitiendo el escape del tumor (Kareva & Berezovskaya 2015).

A continuación se desarrollaran las principales células responsables del ambiente inmunosupresor en el microambiente tumoral, las células T reguladoras, que favorecen el escape del tumor.

Células T reguladoras

Las células T reguladoras (Treg) tienen un rol central en el mantenimiento de la homeostasis inmune, ya que pueden inhibir directamente células presentadoras de antígeno y

células efectoras, o liberar citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10 y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Toda respuesta inmune adaptativa involucra el reclutamiento y la activación de células T y B efectoras así como de células Treg (Sakaguchi et al. 2008). Por lo tanto, el balance de las dos poblaciones, efectoras y reguladoras, va a determinar la calidad y magnitud de la respuesta inmune adaptativa así como la tolerancia a antígenos propios y no propios. Las células Treg expresan específicamente el factor de transcripción Foxp3 (“forhead box P3”), siendo Foxp3 el regulador central del desarrollo y función de éstas células. El factor de transcripción Foxp3 controla la expresión de varios genes característicos para moléculas de superficie celular como puede ser CD25, el receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITR) y el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4). Además, Foxp3 inhibe la producción de citoquinas efectoras, como IL-2 e IFN- γ , dependientes de la activación del TCR (Nishikawa & Sakaguchi 2010). De acuerdo al origen de las células Treg éstas pueden ser divididas en células Treg derivadas del timo (tTreg) o células Treg inducidas en periferia (pTreg). Las células tTreg poseen TCR con mayor afinidad por ligandos MHC-péptidos propios en el timo que otras células T (Sakaguchi et al. 2008). Estas células T altamente auto-reactivas son reclutadas al linaje Treg en el curso de la selección tímica. Las células tTreg expresan fuertemente Helios y Neuropilina 1, que constituyen entonces marcadores de esta población (Jingli Lu et al. 2015). Por otro lado, en la periferia células T naïve bajo ciertas condiciones, por ejemplo por estimulación antigénica en presencia de altas dosis de TGF- β , pueden adquirir la expresión de Foxp3 y por lo tanto funciones de células Treg. Algunas células tumorales pueden estimular a células dendríticas mieloides inmaduras a secretar TGF- β , lo que contribuye a la conversión de células T naïve a células Treg Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ (Nishikawa & Sakaguchi 2010).

Varios mecanismos de supresión por las células Treg han sido propuestos. Se vio que las células Treg Foxp3⁺ pueden suprimir la respuesta inmune por contacto célula-célula con células presentadoras de antígeno o células T efectoras, a través de TGF- β de membrana,

CTLA-4, perforina/granzima, adenosina extracelular, inhibición mediada por AMP cíclico, apoptosis por privación de IL-2, producción de citoquinas inhibitorias como IL-10, IL-35 y TGF- β , y la supresión de la maduración de células dendríticas mediada por LAG2-MHC-II (Vignali et al. 2008; Nishikawa & Sakaguchi 2010).

El rol de las células Treg CD25⁺CD4⁺ en la inmunidad tumoral fue evidenciado en un experimento en el que la administración de un anticuerpo monoclonal depletante anti-CD25 antes de la inoculación del tumor erradicaba tumores singénicos (Onizuka et al. 1999). Por otro lado, se vio que la depleción intratumoral de Treg CD25⁺CD4⁺ inducía una regresión de tumores ya establecidos con un cambio en las citoquinas presentes en el microambiente tumoral (Yu et al. 2005). También se ha reportado que la administración de ciclofosfamida, que elimina preferencialmente células Treg CD25⁺CD4⁺, pero no células T efectoras, activaba células T CD8⁺ específicas de tumor de alta avididad que se encontraban latentes (Ercolini et al. 2005).

Un gran número de células Treg CD25⁺CD4⁺ se encuentran en el microambiente tumoral y en el nódulo linfático que drena el tumor tanto en modelos animales como en humanos con diferentes cánceres. Un número alto de células Tregs Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ presentes en tumores, y particularmente una baja proporción entre células T CD8⁺ y células Tregs Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ en el tumor, se correlaciona con un pobre pronóstico en pacientes con cáncer de mama, de ovarios y gástrico (Nishikawa & Sakaguchi 2010). Se ha propuesto que las células Treg serían reclutadas al tumor debido a la producción de CCL22 por las células tumorales y macrófagos que infiltran el tumor. La quimioquina CCL22 recluta células Tregs CD25⁺CD4⁺ que expresan CCR4. Además, células T no reguladoras pueden ser inducidas a células Treg Foxp3⁺ debido a altas concentraciones de TGF- β secretado por las células tumorales y/o células dendríticas presentes en el tumor (Nishikawa & Sakaguchi 2010).

De manera interesante, se ha encontrado que bajo ciertas condiciones las células Treg Foxp3⁺ pueden perder la expresión de Foxp3 y adquirir funciones efectoras de células Th, produciendo citoquinas como IL-17, IFN- γ e IL-2. Citoquinas de la inmunidad innata como la IL-6 y la IL-1 β son potentes inductores de la re-programación de las células Treg Foxp3⁺ (Mellor & Munn 2011). La IL-1 β es producida por la activación del inflamasoma que se tratará más adelante.

Como se desarrollará más adelante, diferentes terapias contra el cáncer que buscan atenuar la función de las células T reguladoras o depletarlas están siendo desarrolladas.

Entender los mecanismos reguladores del sistema inmune nos provee de ideas de cómo respuestas inmunes débiles, como las que ocurren en pacientes con cáncer o contra antígenos microbianos en infecciones crónicas, pueden ser aumentadas, o de forma contraria, cómo respuestas inmunes fuertes como las que ocurren en el rechazo de trasplantes pueden ser disminuidas.

Inflamasoma en cáncer

La activación del inflamasoma es una función clave mediada por el sistema inmune innato. Los inflamasomas son complejos multiproteicos que se ensamblan en el citosol luego de detectar patrones moleculares asociados a patógenos o a daño (PAMPs o DAMPs, respectivamente). Estos complejos multiproteicos están formados por una proteína sensora perteneciente al receptor AIM2 (ausente en melanoma 2), o a NLR (dominio de unión a nucleótidos conteniendo repetidos ricos en leucina), por la proteína adaptadora ASC (proteína asociada a apoptosis tipo asterisco conteniendo CARD), y un zimógeno inactivo, la pro-caspasa-1 (Vanaja et al. 2015). De acuerdo a los componentes que los constituyen son denominados inflamasoma NLRP1, NLRP3, NLRC4, NLRP6 o AIM2. Los inflamasomas canónicos actúan de andamio para el reclutamiento de la pro-caspasa-1 inactiva. La oligomerización de pro-caspasa-1 induce su clivaje autoproteolítico a la forma activa. La caspasa-1 activa es una

proteasa dependiente de cisteína que cliva los precursores de las citoquinas pro-IL-1 β y pro-IL-18, generando la forma biológicamente activa de estas citoquinas. La caspasa-1 activa también puede inducir a una forma de muerte celular inflamatoria conocida como piroptosis (Zitvogel et al. 2012; Guo et al. 2015).

A continuación me centraré en el inflamasoma NLRP3, el cual es el más estudiado debido a su participación en la inmunidad contra una gran variedad de bacterias, virus, hongos, en la inflamación estéril y en enfermedades metabólicas. Para poder ser activado, el inflamasoma NLRP3 requiere primero de una señal que active el factor de transcripción NF κ B. De esta forma se da la producción de NLRP3, pro-IL-1 β y pro-IL-18 (Figura 5). Esta primera señal también induce la desubiquitinación del NLRP3, lo cual es necesario para que pueda ser activado. Como se dijo anteriormente, el inflamasoma NLRP3 es activado por una gran variedad de estímulos, como bacterias Gram-positivas, virus, toxinas formadoras de poros, cristales, ATP, entre otros, los cuales constituyen la segunda señal. Debido a esta gran heterogeneidad en los estímulos activadores, se cree que en lugar de interactuar directamente con NLRP3, estos activadores inducen uno o más eventos celulares o perturbaciones que llevan a la activación del inflamasoma NLRP3. Los mecanismos de activación del NLRP3 sugeridos por varios estudios incluyen el eflujo de potasio, generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) mitocondriales, la traslocación del NLRP3 a la mitocondria, liberación de catepsinas al citosol dada por desestabilización de la membrana fagolisosomal y liberación de ADN mitocondrial o cardiolipina (Figura 5)(Zitvogel et al. 2012; Vanaja et al. 2015). También se ha reportado que el aumento del calcio intracelular puede activar al inflamasoma (Murakami et al. 2012). El mecanismo preciso de activación del inflamasoma NLRP3 todavía es discutido, ya que no todos estos eventos son inducidos por todos los activadores de NLRP3.

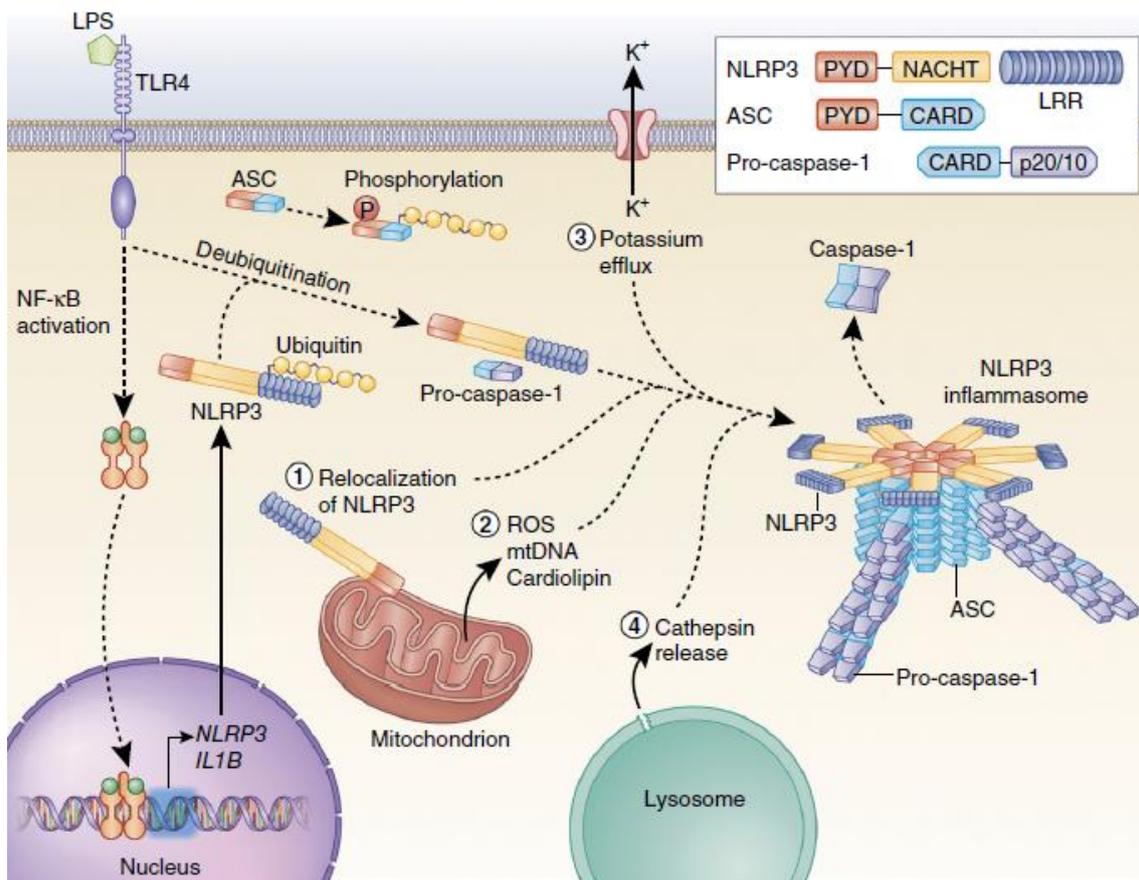


Figura 5. Mecanismo de activación del inflammasoma NLRP3. La activación del inflammasoma NLRP3 requiere de dos señales. La primera constituye un estímulo activador de NF-κB (por ejemplo LPS a través de TLR-4) que induce un aumento de expresión de NLRP3 y producción de pro-IL-1β y pro-IL-18. Esta primera señal también induce la desubiquitinación del NLRP3. La segunda señal activa a NLRP3 e induce la formación del complejo. Los estímulos activadores de NLRP3 más aceptados son: relocalización del NLRP3 a la mitocondria (1), liberación de factores mitocondiales (ROS, ADN mitocondrial, cardiolipina) al citosol (2), eflujo de potasio a través de canales iónicos (3), y liberación de catepsinas luego de la desestabilización de la membrana lisosomal (4). Luego del ensamblado del inflammasoma NLRP3 se da la activación auto-proteolítica de la pro-caspasa-1. La caspasa-1 activa luego cliva la pro-IL-1β y pro-IL-18 para generar sus formas biológicamente activas. *Tomado y modificado de Guo et al. 2015.*

Los inflammasomas pertenecen al sistema inmune innato; sin embargo, son importantes para la inmunidad adaptativa. Los productos de la activación del inflammasoma tienen efectos sobre células de la inmunidad adaptativa. La IL-1β favorece la diferenciación de las células de las células Th17, así como la re-programación de las células Treg a células T secretoras de IL-17. Por otro lado, la IL-18 amplifica la producción de IFN-γ por las células Th1. La expresión del receptor de la IL-18 en las células T es aumentada luego de la exposición a IL-12, una citoquina que polariza hacia Th1. A su vez, la citoquina IL-18 induce la expresión del receptor de alta afinidad de IL-12, estableciéndose un ciclo de amplificación. En cambio, en ausencia de

citoquinas que polarizan a Th1, la IL-18 puede promover la diferenciación de células Th2 (Dostert et al. 2013). Por lo tanto, la IL-1 β e IL-18, generadas por la activación del inflamasoma, son potentes amplificadores de respuestas inmunes adaptativas.

Como se mencionó anteriormente, el cáncer puede surgir como consecuencia de la inflamación crónica. Por lo tanto, la carcinogénesis y la progresión tumoral son estimuladas o inhibidas por procesos inflamatorios e inmunes, respectivamente. Los inflasomas pueden influenciar la formación, progresión y la respuesta terapéutica del cáncer a través de su contribución en la homeostasis tisular, la inflamación y las respuestas inmunes. Se ha reportado que ratones deficientes en NLRP3 presentan menos células mieloides supresoras en el infiltrado tumoral que los ratones “wild type”. La IL-1 β podría conducir directamente a oncogénesis o podría inhibir mecanismos de inmunovigilancia, por lo tanto facilitando el crecimiento tumoral. Además se ha propuesto que la IL-1 β convierte fibroblastos en fibroblasto asociados a cáncer, generando un microambiente que favorece la progresión tumoral.

Por otro lado, existen evidencias que muestran que productos de la activación del inflamasoma, particularmente IL-1 β , tienen roles esenciales en la estimulación de respuestas inmunes adaptativas, importantes en las respuestas contra el cáncer. La IL-1 β estimula la secreción de IL-17 por células T $\gamma\delta$ y la polarización de respuestas de células T $\alpha\beta$ CD8⁺ hacia IFN- γ . El bloqueo de IL-1 β con anakinra o utilizando anticuerpos neutralizantes específicos compromete de forma importante el efecto en la inhibición del crecimiento tumoral por algunos agentes quimioterapéuticos (Zitvogel et al. 2012). Además, como ya se mencionó anteriormente, la IL-1 β puede inducir la re-programación de células T reguladoras a células exTreg con funciones efectoras, y de esta forma favorecer las respuestas anti-tumorales (Mellor & Munn 2011).

De los antecedentes aquí expuestos se puede ver que el inflamasoma tiene roles pleiotrópicos y contradictorios en la oncogénesis. Por un lado afecta positivamente vías de muerte celular autónomas y respuestas inmunes antitumorales, sin embargo, también estimula procesos autócrinos y parácrinos que favorecen la inflamación carcinogénica, el crecimiento tumoral, la metástasis y angiogénesis. Por lo tanto, dependiendo del tipo de cáncer y del estadio del mismo, la inhibición del inflamasoma puede ser una opción terapéutica o ser contraindicado (Zitvogel et al. 2012).

La activación del inflamasoma puede ocurrir en diferentes poblaciones celulares, tanto en células del sistema inmune, como células dendríticas (DCs) y macrófagos, como por células no inmunes como pueden ser las células epiteliales. El estudio del inflamasoma clásicamente se realiza en células dendríticas o macrófagos. Generalmente se utilizan cultivos celulares primarios de células dendríticas o macrófagos derivados de la médula ósea de ratones, o diferenciados a partir de monocitos de sangre periférica de humanos. Otra estrategia es utilizar líneas celulares de monocitos inmortalizados (THP-1), estos últimos son diferenciados a macrófagos mediante la estimulación con PMA.

Inmunoterapias contra el cáncer

Las terapias convencionales contra el cáncer son la resección quirúrgica, la quimioterapia y la radioterapia. La inmunoterapia, que es considerada la cuarta terapia, está tomando cada vez más importancia en el tratamiento del cáncer.

En la quimioterapia se utilizan fármacos que son citotóxicos, matando a células que se dividen rápidamente. Dado que los fármacos citotóxicos utilizados en quimioterapia actúan sobre células que proliferan rápidamente, actuarían también sobre células inmunes proliferantes resultando en inmunosupresión. Además, se pensaba que la muerte celular inducida por la quimioterapia no era inmunogénica. Por estas observaciones, históricamente se pensaba que los beneficios anti-cáncer de la quimioterapia era consecuencia de la

citotoxicidad directa o al arresto permanente de la maquinaria del ciclo celular. Sin embargo, actualmente se reconoce que la muerte celular inducida por algunos quimioterapéuticos (antraciclinas y oxiplatino) genera cambios específicos en la superficie celular y la liberación de mediadores solubles que permiten a las células dendríticas reconocer la célula que está muriendo e iniciar una respuesta inmune anti-tumoral (Gebremeskel & Johnston 2015). En esta muerte celular inmunogénica se observa una re-localización de la proteína de retículo endoplasmático calreticulina a la membrana celular, la cual actúa como señal "cóme-me" al unirse a CD91 en macrófagos y células dendríticas. La unión de la calreticulina a CD91 en estas células presentadoras de antígeno promueve la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF). También se da la liberación de ATP que es esencial para el reclutamiento de células presentadoras de antígeno y la activación subsecuente del inflamasoma para liberar IL-1 β por células dendríticas. La liberación de ATP por la muerte celular inmunogénica media la activación del inflamasoma NLRP3, creando un vínculo entre respuestas inmune innatas y adaptativas. La activación del inflamasoma en células dendríticas lleva a la liberación de IL-1 β , y al reclutamiento posterior de células T $\gamma\delta$ y el "primeado" de células T CD8 contra antígenos tumorales (Gebremeskel & Johnston 2015; Aymeric et al. 2010). Además se observa que en la muerte celular inmunogénica se da una liberación de HMGB1 (del inglés "high-mobility group box 1") el cual señala a través de TLR-4 en las células dendríticas mejorando la presentación de antígeno (Gebremeskel & Johnston 2015; Tesniere et al. 2008).

La radioterapia es un tratamiento contra el cáncer altamente efectivo que lleva al control local del tumor y potencialmente a la cura en etapas tempranas del cáncer. Es bien sabido que la irradiación ionizante dirigida causa la muerte directa de células. Sin embargo, la irradiación es capaz de inducir la reducción del tumor en sitios no irradiados, éste fenómeno es conocido como efecto "abscopal" (Reynders et al. 2015; Kaminski et al. 2005; Demaria & Formenti 2012). El sistema inmune sería el componente clave del efecto "abscopal" luego de la

radioterapia. La radioterapia local, al igual que algunos agentes quimioterapéuticos, induce muerte celular inmunogénica, llevando a respuestas inmunes del hospedero. Como se desarrolló anteriormente, en una muerte celular inmunogénica se da la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) que gatillan la captura de antígenos por las células dendríticas. Esto resulta en una mejor presentación de antígeno al sistema inmune citotóxico. Es conocido que la irradiación además altera el fenotipo inmune del tumor al aumentar la expresión de MHC-I en la superficie de las células tumorales. Por otro lado, la radioterapia induce un patrón de citoquinas que facilita la migración y función de células T CD8 efectoras (Reynders et al. 2015). Sin embargo, los casos reportados de efecto “asbcopal” son pocos, y estudios pre-clínicos sugieren que este efecto inducido sólo por la radioterapia difícilmente tenga un impacto clínico importante en el control de la enfermedad en un contexto de metástasis (Reynders et al. 2015).

Las inmunoterapias contra el cáncer pueden clasificarse como activas o pasivas, dependiendo de su habilidad en desarrollar una respuesta inmune contra las células malignas. Una clasificación alternativa de inmunoterapias contra el cáncer es en base a la especificidad antigénica (Galluzzi et al. 2014). Un ejemplo de inmunoterapia pasiva es la transferencia adoptiva de células T y la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el tumor, ya que estas terapias tienen actividad antineoplásica directa (Galluzzi et al. 2014). En cambio, las vacunas contra el cáncer y los inhibidores de puntos de control (“checkpoints”) inmunes son ejemplos de inmunoterapias activas, al ejercer su efecto luego de la acción del sistema inmune (Galluzzi et al. 2014).

Los anticuerpos monoclonales dirigidos al tumor constituyen la inmunoterapia contra el cáncer mejor caracterizada y la más utilizada en la clínica. Estos anticuerpos pueden alterar la señalización de receptores expresados en la superficie de células malignas, como por ejemplo el anticuerpo monoclonal cetuximab, que se une específicamente al receptor de

crecimiento epidermal (EGFR) e inhibe una vía de señalización necesaria para la supervivencia y progresión de las células neoplásicas (Ming Lim et al. 2013). Otros anticuerpos pueden unirse y neutralizar señales tróficas producidas por las células malignas o por componentes estromales, como puede ser bevacizumab, que neutraliza al factor de crecimiento endotelio vascular A (VEGFA)(Ferrara et al. 2004). Por otro lado, se encuentran los anticuerpos monoclonales que selectivamente reconocen células tumorales basándose en la expresión de antígenos asociados a tumor. Entre estos últimos se encuentran los anticuerpos conjugados con toxinas o radionucleidos, como puede ser gemtuzumab ozogamicina, un conjugado de un anticuerpo anti-CD33 con calicheamicina aprobado para el tratamiento de leucemia mieloide aguda (Galluzzi et al. 2014). Otros anticuerpos monoclonales específicos de antígenos asociados a tumor son capaces de opsonizar a las células tumorales, activar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, la fagocitosis celular mediada por anticuerpos y la citotoxicidad dependiente del complemento. Un ejemplo de estos es el anticuerpo monoclonal rituximab el cual reconoce específicamente CD20, y ha sido aprobado para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica y del linfoma no-Hodgkin (Scott 1998).

Se ha puesto gran esfuerzo en el desarrollo de inmunoterapias contra el cáncer basadas en células dendríticas debido al rol crítico de las células dendríticas en la interface entre la inmunidad innata y adaptativa. Varias inmunoterapias basadas en células dendríticas han sido desarrolladas, la mayoría de las cuales involucra la aislación de monocitos circulantes derivados del paciente o de un donante, que son amplificadas y diferenciadas *ex vivo* en presencia de agentes que promueven la maduración de las células dendríticas. Estas células se las vuelve a inyectar al paciente luego de ser expuestas a antígenos asociados a tumor (Palucka & Banchereau 2012). La idea es que estas células cargadas *ex vivo* con antígenos asociados a tumor cuando son inyectadas pueden promover respuestas inmunes contra esos antígenos asociados a tumor. Otras terapias que tienen como blanco células presentadoras de antígeno son las vacunas basadas en péptidos o ADN.

Dada la importancia de las citoquinas en regular las funciones biológicas, varias citoquinas han sido propuestas para el tratamiento del cáncer, con el fin de generar respuestas inmunes nuevas o reforzar respuestas inmunes anti-tumorales ya existentes. Las citoquinas inmunoestimuladoras son generalmente utilizadas como adyuvantes de otras inmunoterapias contra el cáncer. Algunas citoquinas, como IL-2 e interferón alfa 2b (IFN- α 2b), tienen actividad terapéutica por sí solas en pacientes con melanoma, el cual es particularmente sensible a inmunoterapias. Tanto la IL-2 como el IFN- α 2b están aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA) y otras agencias reguladoras para el tratamiento del melanoma (Galluzzi et al. 2014).

Varios agonistas de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) han sido aprobados por varias agencias reguladoras como la FDA para el uso en pacientes con cáncer. El bacillus Calmette-Guérin (BCG) que sería un agonista de TLR2/TLR4 actualmente es utilizado como agente inmunoterapéutico en pacientes con cáncer de vejiga (Hoffman et al. 2005).

Por otro lado se encuentran las inmunoterapias que tienen como blanco vías reguladoras en las células T. La activación de las células T requiere de al menos dos señales, la primera el reconocimiento mediado por el receptor de células T (TCR) de un antígeno, y la segunda la unión de CD28 a la molécula coestimuladora B7. Una vez activada, las células T aumentan la expresión de dos moléculas co-inhibidoras, el antígeno asociado a linfocito T citotóxico (CTLA-4) y la molécula de muerte programada 1 (PD-1). La función de estas moléculas co-inhibidoras es de regular la respuesta inmune al controlar la activación excesiva de células T. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales contra estos puntos de control para potenciar la respuesta inmune antitumoral presente. En los últimos años la FDA ha aprobado fármacos dirigidos contra estos puntos de control para el tratamiento de melanoma. El anticuerpo contra CTLA-4 ipilimumab fue aprobado por la FDA en 2011, mientras que dos anticuerpos contra PD-1 (pembrolizumab y nivolumab) fueron aprobados en 2014. Estas

terapias representan un cambio radical en la terapéutica del cáncer de dos maneras, por un lado no tienen como blanco las células tumorales, sino que tienen como blanco moléculas involucradas en la regulación de células T. Por otro lado, no tienen como objetivo activar al sistema inmune para atacar a las células tumorales, sino que buscan eliminar vías inhibitorias que bloquean respuestas T antitumorales efectivas (Sharma & Allison 2015). Además, parte de la actividad antitumoral del ipilimumab se atribuye a la depleción de células Treg Foxp3⁺CD4⁺ del tejido tumoral mediado por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Nishikawa & Sakaguchi 2014). El bloqueo de puntos de control inmunes que tienen como blanco otras moléculas, como LAG3, se encuentran en estudios clínicos.

Varias inmunoterapias están siendo estudiadas pero que aún no cuentan con la aprobación por la FDA, como puede ser la transferencia adoptiva de células, vacunas basadas en péptidos o en ADN, e inhibidores del metabolismo inmunosupresivo. Un ejemplo de estos últimos es el indoximod o 1-metil-D-triptófano, el cual es un inhibidor de la idoleamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO1) y se encuentra en estudios de fase I-II.

Recientemente, la FDA aprobó el tratamiento de melanoma no resecable con un virus vivo oncolítico (Imlygic), el mismo es un virus de herpes modificado genéticamente. Este virus es inyectado directamente en las lesiones de melanoma, replica dentro de las células tumorales y causa la muerte de estas células tumorales.

Diferentes terapias combinadas están siendo investigadas. La combinación de radioterapia y el bloqueo de CTLA-4 con ipilimumab ha sido evaluado en diferentes ensayos clínicos observándose el efecto “abcopal” (Golden et al. 2013; Stamell et al. 2015; Postow et al. 2012). La combinación de radioterapia con el bloqueo de PD-1/PD-L1 debe ser evaluada. Estas terapias pueden tener efecto sinérgico, ya que las células T reguladoras son más radioresistentes que otras células T, y esto puede ser contrarrestado por terapias que buscan bloquear puntos de control (Reynders et al. 2015). La combinación de inmunoterapias con

agentes quimioterapéuticos que inducen muerte celular inmunogénica potencialmente podrían llevar a una mayor eficiencia y menor toxicidad que las estrategias terapéuticas actuales (Gebremeskel& Johnston 2015). Por otro lado, la combinación del bloqueo de puntos de control y anticuerpos co-estimuladores (por ejemplo un anticuerpo contra CD137) podría tener efectos antineoplásicos mayores.

El estudio de moléculas inmunomoduladoras, como pueden ser CTLA-4 y PD-L1, han llevado al desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer eficientes. Por lo tanto, el estudio de otras moléculas inmunomoduladoras como puede ser Tmem176B, que se desarrollará a continuación, puede aportar conocimiento para aumentar el panel de inmunoterapias disponibles para el tratamiento del cáncer.

Tmem176B y Tmem176A

Tmem176B y Tmem176A, también conocidos como TORID y HCA-112 respectivamente, son proteínas intracelulares transmembrana que pertenecen a la familia de proteínas MS4A (del inglés “membrane-spanning 4-domains subfamily A”)(Louvet et al. 2005). Estudios filogenéticos sugieren que los genes Tmem176 comparten un gen ancestral común con la familia de genes MS4A, pero que divergieron y sufrieron expansión independiente (Zuccolo et al. 2010; Louvet et al. 2005). Estas proteínas presentan cuatro dominios transmembrana hidrofóbicos interconectados por un “loop” intracelular y dos “loops” extracelulares con ambos extremos N- y C-terminal hacia el citosol (Figura 6) (Eon Kuek et al. 2015). Mediante análisis de la secuencia de Tmem176B, EonKuek et al. predicen que Tmem176B contiene un motivo ITIM (del inglés “inmunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif”), estos motivos clásicamente se asocian con la propagación intracelular de señales inhibitoras. La relevancia fisiológica de esta predicción resta ser explorada. Tmem176B y Tmem176A se localizan en el cromosoma 7q36.1 en humanos, en el 4q24 en ratas y en el 6B2.3 en ratones.

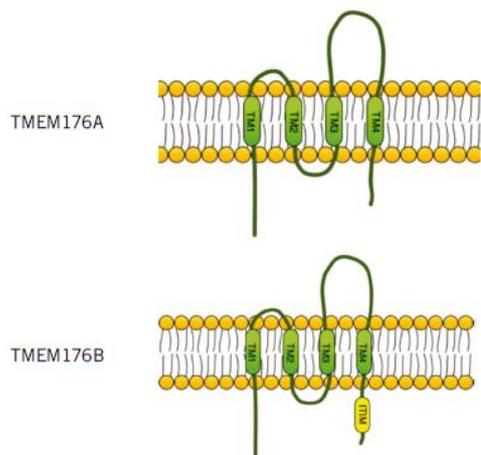


Figura 6. Topología predictiva de Tmem176A y de Tmem176B. Tmem176A y Tmem176B son proteínas intracelulares con 4 dominios transmembrana, con los extremos amino y carboxi-terminal hacia el citosol. Tomado y modificado de EonKuek et al. 2015.

Tanto Tmem176B como Tmem176A están expresados de forma ubicua. Se ha reportado alta expresión de ARNm de Tmem176B en pulmón, riñón, nódulos linfáticos y bazo. El patrón de expresión de Tmem176A es similar, encontrándose alta expresión en pulmón, riñón y bazo (Condamine et al. 2010). A nivel la expresión en subtipos de células del sistema inmune, Tmem176A y Tmem176B presentan una alta expresión en células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDCs) y en células dendríticas convencionales. También están expresados en granulocitos, monocitos y en células dendríticas plasmocitoides (Condamine et al. 2010). La expresión de Tmem176B y Tmem176A ha sido asociada al estado inmaduro de los monocitos y células dendríticas, disminuyendo su expresión notoriamente luego de la estimulación inflamatoria (Condamine et al. 2010).

Tmem176B y Tmem176A interaccionan físicamente posiblemente formando multímeros (Cuajungco et al. 2012; Condamine et al. 2010).

Previamente se había reportado un aumento en la expresión de Tmem176B en corazones aloinjertados tolerados en comparación con los rechazados o los injertos singénicos

(Louvet et al. 2005). La función de esta proteína era desconocida al momento de este hallazgo. Recientemente se ha reportado que Tmem176B regula el pH fagosomal en BMDCs y de esa manera controla el procesamiento de antígenos exógenos para ser cargados en el MHC de clase I (vía de la presentación cruzada) (Segovia et al. 2014). Estudios en oocitos de *Xenopus* en complemento de estudios en BMDCs demostraron que Tmem176B es un canal/transportador iónico, que en la membrana de fagosomas regula el pasaje de cationes lo que impacta directamente en la actividad V-ATPasa y de esa manera en el pH fagosomal (Segovia et al. 2014). En un modelo de trasplante, se demostró in vivo que Tmem176B promueve el procesamiento de antígenos del órgano trasplantado a través de la presentación cruzada en BMDC tolerógenas. Esa presentación cruzada dependiente de Tmem176B conduce a la generación de células Treg CD8⁺CD11c⁺ específicas de los antígenos del donante en el ganglio que drena el órgano trasplantado (Segovia et al. 2014). En ese trabajo, nuestro equipo demostró también de forma directa que las Treg CD8⁺CD11c⁺ inhiben el rechazo del trasplante.

Tmem176A y Tmem176B han sido asociados con el cáncer. Tmem176A humano fue inicialmente identificado en una búsqueda de antígenos asociados a tumor en carcinoma hepatocelular (Wang et al. 2002). Más recientemente, se ha reportado una acumulación anormal de Tmem176A y de Tmem176B en determinados tipos de cáncer (Cuajungco et al. 2012). Cuajungco et al. observaron una mayor expresión de Tmem176A en carcinoma de pulmón con respecto a tejido normal, así como un aumento en la expresión de Tmem176A y Tmem176B en linfoma. A su vez, vieron que la relación entre la expresión de Tmem176A y Tmem176B cambiaba significativamente en pacientes con cáncer de mama, de hígado, de tejido linfoide y de piel, con respecto a pacientes normales (Cuajungco et al. 2012). Por otro lado, se ha reportado una sobre-expresión de Tmem176B en células endoteliales tumorales, estando involucrada en la migración de estas células (Otsubo et al. 2014).

Recientemente se encontró a Tmem176B sobre-expresado en células dendríticas migradoras que inhiben la respuesta inmune a vacunas (Anandasabapathy et al. 2014), así como en células dendríticas involucradas en la diferenciación de las células Th2 (Gao et al. 2013).

De los antecedentes desarrollados se desprende el rol de Tmem176B y Tmem176A en la regulación del sistema inmune. A través de mecanismos que aún deben ser estudiados, estas proteínas tienen efectos reguladores sobre las respuestas inmunes.

Objetivos

Teniendo en cuenta los antecedentes de nuestro equipo y de otros investigadores comentados en la introducción, Tmem176B emerge como una nueva molécula inmunoreguladora. Nuestra hipótesis de trabajo es que Tmem176B podría inhibir las respuestas inmunes anti-tumorales y de esta manera favorecer el crecimiento tumoral. Si esta especulación fuera correcta, Tmem176B podría ser considerado un nuevo blanco anti-tumoral.

El objetivo general del presente trabajo de tesis de Maestría fue la caracterización de Tmem176B como un nuevo blanco molecular para la modulación de la respuesta inmune anti-tumoral.

Objetivos específicos

- I. Estudio del desarrollo tumoral en ratones Tmem176B^{+/+} y Tmem176B^{-/-}.
- II. Caracterización de la respuesta inmune anti-tumoral en ratones Tmem176B^{+/+} y Tmem176B^{-/-}.
- III. Estudio electrofisiológico de Tmem176B y Tmem176A
- IV. Estudio de canales iónicos en la activación del inflamasoma NLRP3

Materiales y Métodos

Líneas celulares

La línea celular de origen murino EG7-OVA (linfoma tímico) fue cultivada en medio DMEM suplementado con 10% suero bovino fetal (SBF), HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM, β -mercaptoetanol 0.05 mM, penicilina 10 unidades/mL, estreptomycin 10 μ g/mL y 0.4 mg/mL de geneticina. La línea celular de origen murino LL/2 (cáncer de pulmón) fue cultivada en medio DMEM suplementado con 10% SBF, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 10 unidades/mL y estreptomycin 10 μ g/mL. Por otro lado, la línea celular de hámster Chinese Hamster Ovary (CHO) fue cultivada en medio DMEM suplementado con 10% SBF, HEPES 10 mM, MEM-aminoácidos no esenciales 1X, penicilina 10 unidades/mL y estreptomycin 10 μ g/mL. Todas las líneas celulares se mantuvieron en estufa a 37°C en presencia de 5% de CO₂.

Ratones

Se utilizaron ratones C57BL/6 *Tmem176B*^{+/+} y *Tmem176B*^{-/-} “littermates” de entre 6 y 12 semanas. Los ratones fueron criados en la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) del Institut Pasteur de Montevideo en condiciones libres de patógenos específicos (SPF). Éstos fueron mantenidos en un ambiente controlado, con temperatura entre 19 y 21°C, y ciclos de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Los ratones recibieron agua y ración estéril administradas en condiciones *ad libitum*.

*Estudio del desarrollo tumoral en ratones *Tmem176B*^{+/+} y *Tmem176B*^{-/-}*

El modelo de cáncer trasplantable consistió en la inyección subcutánea de 2×10^6 células EG7-OVA o 1×10^5 células LL/2 a ratones *Tmem176B*^{+/+} y *Tmem176B*^{-/-}. Se controló el crecimiento tumoral por palpación cada 3 días una semana luego de la inyección. El tamaño del tumor se calculó como: Diámetro mayor x diámetro menor, expresándose en mm². Los ratones fueron eutanasiados cuando cumplían con el criterio de punto final. Como punto final

se tomó deterioro notorio del animal, ulceración o un tumor de tamaño superior a 20 mm de diámetro. La supervivencia de los ratones se analizó estadísticamente con el análisis de Log-rank (Mantel-Cox) con el software GraphPad Prism.

*Caracterización de la respuesta inmune anti-tumoral en ratones *Tmem176B*^{+/+} y*

****Tmem176B*^{-/-}***

RT-PCR cuantitativa

Se reseco el ganglio drenante del tumor y el tumor de ratones luego de 10 días de la inyección de 2×10^6 células EG7-OVA. Se extrajo el ARN mediante la técnica del Trizol-Cloroformo. Brevemente, el ganglio o tumor congelado se colocó en un eppendorf con 1 mL de Trizol se disgregó y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se le agregó 200 μ L de cloroformo, se “vortexeó” 30 segundos y dejó 2-3 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó durante 15 minutos a 12000 g a 4°C. Se recuperó la fase acuosa superior y se le agregó 500 μ L de isopropanol. Se agitó suavemente y se guardó a -20°C durante la noche. Al otro día se dejó 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 20 minutos a 12000 g y 4°C. Al “pellet” se le agregó 1 mL de etanol 75% frío y se centrifugó 5 minutos a 7500 g a 4°C. Se repitió este paso otra vez más y el “pellet” se dejó secar. El “pellet” seco se resuspendió en 20 μ L de agua ultra pura libre de ADNasas y ARNasas. Se cuantificó el ARN extraído y se evaluó su pureza, por la relación A260nm/A280nm, en Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). En todos los casos se retrotranscribió la misma cantidad de ARN a ADNc mediante el uso de “Random Primers”. Se realizaron PCR cuantitativa para diferentes moléculas (ver Tabla 1) en ViiA7 Real Time-PCR System (Thermo Fisher Scientific) o Eco Real Time-PCR System (Illumina) utilizando como sonda al SYBR Green (Life Technologies o KapaBiosystems). La expresión relativa de cada gen se calculó como $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, siendo el $\Delta\Delta Ct$ para un gen X:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{X \text{ muestra}} - Ct_{GAPDH \text{ muestra}}) - (Ct_{X \text{ calibrador}} - Ct_{GAPDH \text{ calibrador}})$$

Como calibrador se utilizó ADNc obtenido de esplenocitos activados con Concanavalina

A. Para el análisis de los resultados se realizó el test estadístico de Mann-Whitney con el software GraphPad Prism.

Tabla 1. Lista de moléculas evaluadas en q RT-PCR.

	Secuencia de los primers
IL-4	GGTCTCAACCCCCAGCTAGT GCCGATGATCTCTCTCAAGTGAT
IL-6	GAGGATACCACTCCCAACAGACC AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA
IL-12	GGAAGCACGGCAGCAGAATA AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG
IL-10	CCAAGCCTTATCGGAAATGA TTTTCACAGGGGAGAAATCG
IL-13	CCTGGCTCTTGCTTGCCCTT GGTCTTGTGTGATGTTGCTCA
IFN- γ	TGGCTCTGCAGGATTTTCATG TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA
CCL2	TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT
CCL5	ACTCCCTGCTGCTTTGCCTAC GAGGTTCCCTTCGAGTGACA
CCL19	GACCTTCCCAGCCCCAACT CGGAAGGCTTTACGATGTT
CCL22	CACCCTCTGCCATCACGTTT CCTGGGATCGGCACAGATAT
TNF- α	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA
TGF- β	TGACGTCACTGGAGTTGTACGG GGTTCATGTCATGGATGGTGC
CEBPb	GGAGACGCAGCACAAGGT AGCTGCTTGAACAAGTTCCG
NOS2	GTTCTCAGCCCAACAATAAAGA GTGGACGGGTCGATGTCAC
PD-L1	ATGCTCAGAAGTGGCTGGAT TGCTGCATAATCAGCTACGG
CTLA-4	CTGAAGGTTGGGTACCTGT TGGACTCCGGAGGTACAAAG
FoxP3	TCCAAGTCTCGTCTGAAGGC GCGAAAGTGGCAGAGAGGTA
Tbet	GTCTGGGAAGCTGAGAGTCG CTTCCACACTGCACCCACT
RORyt	GGAGGACAGGGAGCCAAGTT AGTAGGCCACATTACACTGCT
GATA3	AGGATGTCCCTGCTCTCCTT GCCTGCGGACTCTACCATAA
IL-17A	AGTCCAGGGAGAGCTTCATCT TCTTCATTGCGGTGGAGAGTC
IL-17F	GAAGTGCACCCGTGAAACAG AACTGGAGCGGTTCTGGAAT
Fas	AGTTTCATGAACCCGCTC GCAGACATGCTGTGGATCTG
GAPDH	CTACAGCAACAGGGTGGTGG TATGGGGGTCTGGGATGG

Fenotipado del infiltrado tumoral por Citometría de flujo

Tumores de ratones *Tmem176B^{+/+}* y *Tmem176B^{-/-}* fueron resecados 14 días luego de la inyección de 2×10^6 células EG7-OVA. Los tumores fueron disgregados con Colagenasa D 2 mg/mL en medio DMEM y con 2% de suero bovino fetal, durante 10 minutos a 37°C. Luego se pasaron por filtro de 100 μ m, se contaron las células, se lavaron con buffer PSA (PBS 2% SBF 0,2% azida de sodio) y se incubaron con anticuerpos dirigidos contra moléculas características de determinadas poblaciones celulares del sistema inmunológico (CD4, CD8, TCR β , CD11c, CD11b, MHC-II, FoxP3, CD19, NK 1.1, Gr1, ROR γ t). Las células EG7-OVA, línea de linfoma tímico, derivan de un clon de linfocito T cuyo TCR está compuesto por el segmento génico V β 12. Por lo tanto, mediante un anticuerpo anti-TCR V β 12 se puede diferenciar las células tumorales de los linfocitos T que infiltran el tumor. Poblaciones de células T específicas contra la OVA fueron identificadas mediante el uso de pentámeros de MHC-I-OVA conjugados a APC. La activación de caspasa-1 se identificó mediante la sonda FLICA 660-YVAD-FMK (ImmunoChemistry Technologies), la cual se une irreversiblemente a la caspasa-1 activa. Las adquisiciones se realizaron en citómetro BD FACSAria Fusion (BD Bioscience) o CyAn ADP Analyzer (BeckmanCoulter). Los análisis de las adquisiciones se realizaron con el software FlowJo. Para el análisis de los resultados obtenidos se realizó el test estadístico t de Student con el software GraphPad Prism.

Western Blot anti-OVA de células EG7

En un gel de 12% de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE) se sembró 10 ng de proteína OVA pura o 30 μ g proteínas de un lisado celular de EG7. Previo al sembrado, las muestras se diluyeron en buffer de carga (β -mercaptoetanol 25%, SDS 2.5%, Glicerol 50%, Buffer Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, Azul de bromofenol 0.1 mg/mL) y se hirvieron durante 3min para la desnaturalización de las proteínas. Se corrió durante 1h a 150 V y luego se transfirió a una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (GEHealthcare) mediante la técnica de

electrotransferencia semi-seca durante 25 min a 25 V. La membrana se bloqueó durante 2h con TBS-BSA3%, se lavó con TBS-Tween20 0.1% y se incubó durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo anti-OVA (1 µg/mL) diluido en TBS-BSA 1%-Tween20 0.1%. Al otro día se lavó la membrana y se incubó durante 1h con el anticuerpo secundario anti-conejo-peroxidasa diluido en TBS-BSA 1%-Tween20 0.1%. Luego se lavó nuevamente la membrana y se reveló con ECL (GEHealthcare).

Estudio del rol de Tmem176B en la activación del inflammasoma NLRP3

La estimulación del inflammasoma NLRP3 in vitro se realizó en células dendríticas derivadas de la médula ósea de ratones Tmem176B^{-/-} y WT. Para la obtención de estas células se extrajo la médula ósea del fémur y tibia, se lisaron los glóbulos rojos y se colocaron 5×10^6 células en 10 mL de medio completo con 1 µL de GM-CSF (obtenido del sobranadante de cultivo de la línea celular J558) por placa de petri de plástico no tratado. El medio para estas células fue RPMI complementado con 10% de suero bovino fetal, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 10 unidades/mL, estreptomina 10 µg/mL, HEPES 10 mM, MEM-aminoácidos no esenciales 1X y β-mercaptoetanol 0.02mM. Al tercer día de comenzado el cultivo se agregó 10 mL de medio completo con 1 µL de GM-CSF por placa. Luego, al día 6 se extrajo 10 mL de medio por placa, se centrifugó, se resuspendieron las células en 10 mL de medio fresco con 1 µL de GM-CSF y se volvieron a depositar en la placa. Al octavo día se despegaron las células adherentes con PBS-2% suero bovino fetal-0.7 mM EDTA frío, y se colocaron 5×10^4 células por pocillo de placa de 96 pocillos. Alrededor del 98% de las células obtenidas fueron CD11c⁺.

Luego de que se adhirieron se procedió a la estimulación del inflammasoma. Se estimularon a las células durante 3 horas con 0.25 µg/mL de LPS. Luego se lavaron con PBS y se estimularon con diferentes activadores del inflammasoma NLRP3: 0.5 mM de ATP, 2.5 mM de nigericina o 500 µg/mL de hidróxido de aluminio (Alum), durante 2 horas. Pasadas las 2h se

recuperó el sobrenadante. Se cuantificó la IL-1 β del sobrenadante mediante un kit de ELISA para IL-1 β (BD Bioscience).

El protocolo para el análisis de la estimulación por Western Blot fue ligeramente diferente. Se colocaron 1×10^6 células adherentes por pocillo de placa de 6 pocillos, y la incubación con nigericina fue en medio sin suero. Luego de las 2 horas de estimulación con nigericina, se recuperó el sobrenadante, del cual se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético 20% y acetona. Las proteínas precipitadas se resuspendieron en 20 μ L de buffer de carga, los cuales se sembraron en un gel de 12% de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE). Por otro lado, se lisaron las células con buffer RIPA (50 mM Tris pH 7.4, 1% NP40, 0,25% deoxicolato de sodio, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) y se le agregó inhibidores de proteasas. Se sembró 30 μ g de proteínas del lisado por pocillo. Se corrió el gel por 1h a 150 V y se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL mediante electotransferencia semi-seca durante 20 min a 20 V. La membrana se bloqueó durante 2h con TBS-3% leche, se lavó con TBS-Tween20 0.1% y se incubó durante toda la noche a 4 $^{\circ}$ C con un anticuerpo anti-IL-1 β (0.5 μ g/mL) diluido en TBS-1% leche-Tween20 0.1%. Al otro día se lavó la membrana y se incubó durante 1h con el anticuerpo secundario anti-conejo-peroxidasa diluido en TBS-BSA 1%-Tween20 0.1%. Luego se lavó nuevamente la membrana y se reveló con ECL (GEHealthcare).

La activación *in vivo* del inflammasoma NLRP3 se evaluó por el reclutamiento de neutrófilos dependiente de IL-1 β al peritoneo. Para eso se inyectaron ratones Tmem176B $^{-/-}$ y WT con 25 μ g de hidróxido de aluminio en 200 μ L de PBS intraperitoneal. Luego de 16 horas se realizó lavado peritoneal con 5 mL de PBS-EDTA 3 mM. Se recuperó 1 mL del lavado peritoneal, se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm. Se guardó el sobrenadante a -20 $^{\circ}$ C y el pellet celular se resuspendió en PSA y se marcó con anticuerpos anti-Ly6G-PE, anti-Ly6C-FITC y anti-CD11b-PE-Cy7. Mediante el citómetro BD Accuri C6 (BD Bioscience) se adquirió el mismo

volumen (50 μL) para todas las muestras y se contó las células en el ventana de los neutrófilos ($\text{CD11b}^+\text{Ly6C}^{\text{low}}\text{Ly6G}^+$). Los análisis de las adquisiciones se realizaron con el software FlowJo. Para el análisis de los resultados obtenidos se realizó el test estadístico t de Student con el software GraphPad Prism.

Caracterización electrofisiológica de Tmem176B y Tmem176A

Las células CHO se dejaron adherir a cubreobjetos de vidrio durante 24-48h, luego se transfectaron con Tmem176b-GFP y Tmem176a-mCherry por el método de lipofectamina. Brevemente, por pocillo de placa de p24 se incubó durante 15 minutos 0.4 μg de plásmido con 4 μL de Plus Reagent (Invitrogen) en 25 μL de medio DMEM sin suero. Luego se agregó 25 μL de medio DMEM sin suero con 1 μL de Lipofectamina LTX (Invitrogen), y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células con PBS y se le agregó 200 μL de medio DMEM sin suero y se le agregó los plásmidos previamente incubados con Plus Reagent y Lipofectamina.

Evaluamos la re-localización de TORID-GFP y HCA-mCherry a la membrana plasmática luego de la estimulación con 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA). Para eso, luego de 24 horas de la transfección se incubaron a las células con 100 nM de PMA durante diferentes tiempos (5, 10, 15 y 20 minutos), y se fijaron con paraformaldehído 4%, y se montaron en Prolong-DAPI. Estas láminas se observaron en microscopía confocal.

Los estudios electrofisiológicos también se realizaron 24 horas luego de la transfección. Las células adheridas a un pequeño cubreobjeto fueron colocadas en una cámara de registro, bañadas en solución extracelular y visualizadas con un microscopio Olympus BX51WI utilizando iluminación oblicua y un objetivo de inmersión en agua 40X (0.8 de apertura numérica). Las células transfectadas fueron seleccionadas por excitación de GFP o mCherry utilizando luz de longitud de onda adecuada.

Los registros se realizaron a temperatura ambiente (20-22°C) usando un amplificador Multiclamp 700B (Axon Instruments, Molecular Devices). Los protocolos de estimulación tanto en fijación de voltaje fueron generados con el programa pClamp 10. Las pipetas se estiraron a partir de tubos de vidrio de borosilicato usando un estirador de pipetas Sutter P87. La pipeta de “patch” se cargó con solución intracelular (140 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES y 10 mM EGTA, el pH se ajustó a 7.3 con KOH) y presentó una resistencia de 4-7 MΩ. A la solución intracelular se le agregó 100 nM PMA (forbol 12-meristato 13-acetato) para inducir el transporte de TORID y HCA hacia la membrana plasmática de las células CHO. Las células se mantuvieron en la cámara de registro bañadas con solución extracelular (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES y 10 mM D-glucosa, el pH se ajustó a 7.3 con NaOH). La pipeta de “puff” se cargó con medio extracelular ajustando el pH a 5, para lo mismo se sustituyó el HEPES por 10 mM de MES. La solución extracelular con pH5 fue aplicada por presión desde pipetas con una punta de 2 μm de diámetro utilizando un Picospritzer III (Parker Instrumentation) controlado por el pClamp 10. Las respuestas a la aplicación local fueron registradas a diferentes potenciales de mantenimiento. Se realizaron relaciones corriente-voltaje para analizar el potencial de reversión de las respuestas.

Estudio de canales iónicos en la activación del inflamasoma NLRP3

Para el estudio de la modulación del inflamasoma NLRP3 por canales iónicos se utilizaron BMDCs generadas como se mencionó anteriormente a partir de ratones C57BL/6. El protocolo de estimulación fue básicamente el mismo. Brevemente, al día 8 se despegaron las células adherentes y se colocaron 5×10^4 células por pocillo en placa de 96 pocillos. Se dejaron adherir durante 2h y luego se incubaron con LPS 0,25 μg/mL durante 3h. Se lavaron las células y se las incubó con los distintos inhibidores y activadores a distintas concentraciones (1, 10 o 50 μM) durante 30 minutos (Tabla 2). Pasado este tiempo, se les agregó ATP para una concentración final de 0,5 mM (sin quitar los fármacos) y se incubó durante 2h. Luego se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de IL-1β por ELISA. Algunos de los

fármacos se encuentran disueltos en DMSO, por lo tanto para eliminar el posible efecto del DMSO sobre la activación del NLRP3 se utilizó como control BMDCs estimuladas con DMSO 0.5% y ATP 0.5 mM.

De los resultados obtenidos en el “screening” se decidió estudiar a los moduladores de los canales de calcio de tipo L (nifedipina, diltiazem, verapamil y BAY K-8644). Las estimulaciones en este caso se realizaron en placas de 6 pocillos colocando 1×10^6 BMDCs adherentes por pocillo. Se estimularon durante 3h con LPS 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se lavaron, y se incubaron durante 30 minutos con nifedipina 50 μM , diltiazem 50 μM , verapamil 50 μM o BAY K-8644 50 μM en medio sin suero. Pasado este tiempo se les agregó ATP para una concentración final de 0,5 mM y se incubó durante 2 horas. Se recuperó el sobrenadante y se lisaron las células. Mediante el mismo protocolo detallado anteriormente (ver Estudio del rol de Tmem176B en la activación del inflammasoma NLRP3) se determinó la concentración de IL-1 β por ELISA y por Western blot para IL-1 β se observó la pro-IL-1 β (37 KDa) y la IL-1 β (17 KDa).

Para evaluar la importancia del eflujo de K⁺ en la activación del NLRP3 por BAY K-8644 se realizaron las estimulaciones en medio con concentración normal de K⁺ (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES y 10 mM D-glucosa), y en medio con concentración alta en K⁺ (137 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES y 10 mM D-glucosa).

Tabla 2. Inhibidores y activadores de diferentes canales iónicos evaluados.

Antibiótico A-23187	Ryanodine	Cyclopiazonic acid	Gigerol	Thapsigargin
Dantrolene	Amiloride	Benzamil	BAY K8644	TMB-8
Diltiazem	Flunarizine	FPL-64176	Nifedipine	Nimodipine
Nitrendipine	SDZ-202791	SKF-96365	Tetrandrine	Verapamil
Bepriidil	Amiodarone	YS035	Niguldipine	Nicardipine
Pimozide	Loperamide	U-50488	Dichlorobenzamil	U-37886A
E-4031	Diazoxide	Glyburide	5-Hydroxydecanoate	Minoxidil sulfate
Paxiline	PCO-400	Panitrem A	Tolazamide	NS-1619
ZM 226600	AM 92016	Fluspirilene	Tolbutamide	Pinacidil
4-Aminopyridine	Glipizide	Phentolamine	Quinine	Flufenamic acid
QX-314	SDZ-201106	Veratridine	Phenytoin	Grayanotoxin III
Aconitine	Procainamide	Lidocaine	Quinidine	Flecainide
Phenamil	IAA-84	NPPB	Fipronil	N-Phenylanthranilic
Amantidine	Niflumic acid			

Resultados

I. Estudio del desarrollo tumoral en ratones *Tmem176B*^{+/+} y *Tmem176B*^{-/-}

Para comenzar a estudiar nuestra hipótesis se inyectaron ratones “wild-type” (WT) y “knock-out” (KO) para *Tmem176B*, de aquí en más TORID, con células tumorales EG7 o LL2. La línea celular EG7 es una línea murina de linfoma tímico, mientras que la línea LL2 es una línea murina de carcinoma de pulmón. Previamente se puso a punto el número de células a inyectar para cada línea celular, eligiéndose la menor cantidad de células que generaba el crecimiento del tumor en todos los ratones WT. Evaluamos el crecimiento tumoral y la supervivencia de estos ratones, y encontramos que los ratones “knock-out” para TORID presentaban un crecimiento tumoral más lento que los ratones “wild-type” (Figura 7A-B). De hecho, cerca de dos tercios de los ratones KO no desarrollaron tumor. Cuando evaluamos la supervivencia de los ratones, encontramos que los ratones KO tenían significativamente una mejor supervivencia que los ratones WT (Figura 7C-D).

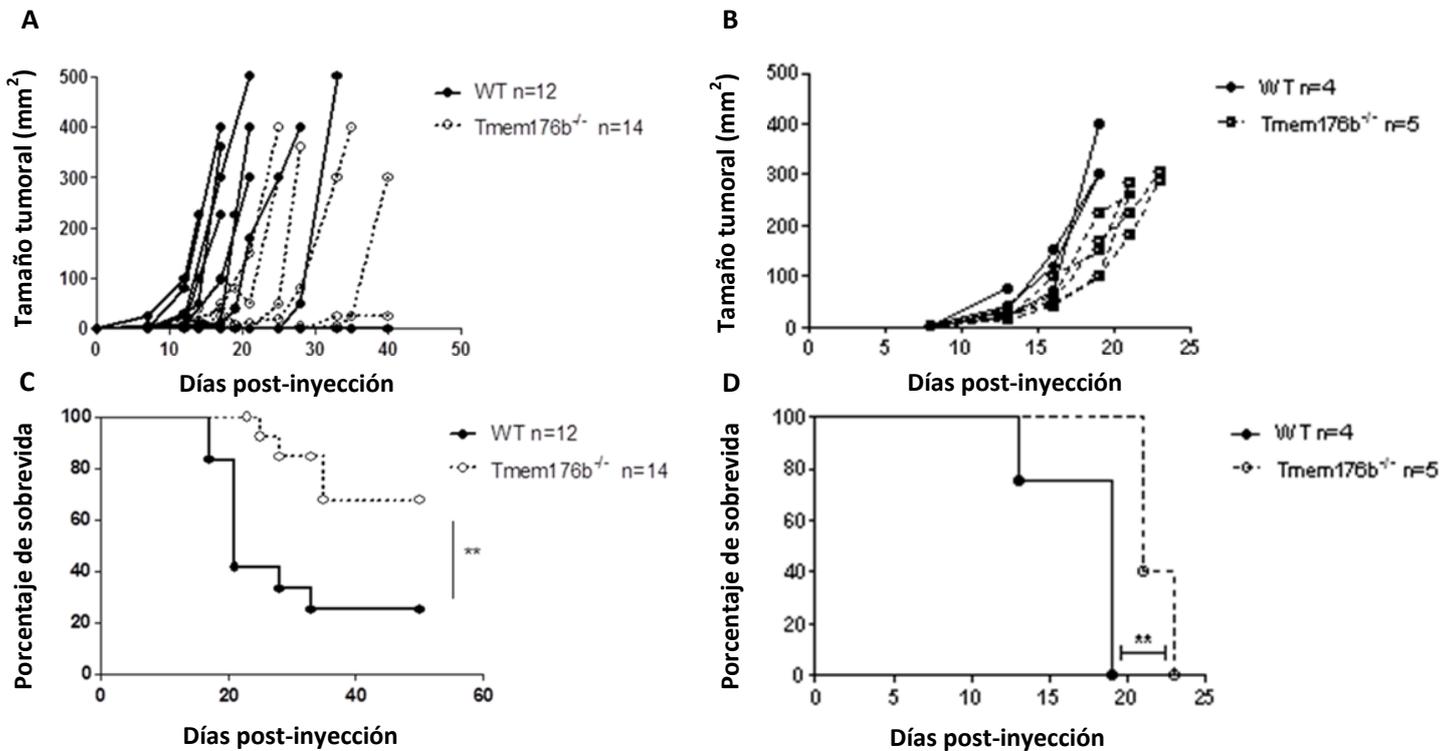


Figura 7. Desarrollo tumoral en ratones TORID KO y WT. Se inyectaron ratones con 2×10^6 células EG7 o 10^5 células LL2 vía subcutánea. Encontramos un menor crecimiento tumoral en los ratones TORID KO (línea punteada) que los ratones WT (línea entera), tanto para la línea EG7 (A) como para la línea LL2 (B). Los ratones TORID KO presentaron una mayor supervivencia que los ratones WT luego de la inyección de células EG7 (C) o LL2 (D). Se inocularon 14 ratones TORID KO y 12 ratones WT con células EG7, mientras que se inyectaron 5 ratones TORID KO y 4 ratones WT con células LL2. ** $p < 0.01$

Dada la diferencia en el crecimiento tumoral y la supervivencia entre los ratones WT y TORID KO nos preguntamos qué mecanismos anti-tumorales estaban implicados en esta diferencia. Para intentar contestar esta pregunta estudiamos el ganglio drenante del tumor así como el tumor.

II. Caracterización de la respuesta inmune anti-tumoral en ratones Tmem176B^{+/+} y Tmem176B^{-/-}

Evaluación de la expresión de diferentes moléculas por PCR cuantitativa

Abordamos este punto a través de un ensayo amplio, no guiado por hipótesis previas, y evaluando tanto el microambiente tumoral como el ganglio que drena el tumor.

Luego de 10 días de la inyección de las células tumorales EG7 se sacrificaron los ratones, se extrajo el ganglio drenante del tumor y se evaluó la expresión de diferentes moléculas del sistema inmune por PCR cuantitativa (Tabla 1). Para la mayoría de las moléculas no encontramos diferencias significativas (Figura 8). Sin embargo, encontramos una diferencia significativa en la expresión de FoxP3, CTLA-4, CCL5, CCL19 y CCL22 (Figura 9). En todos los casos evidenciamos una menor expresión en los ganglios drenantes del tumor de los ratones TORID KO con respecto a los WT. Lo que sugiere una reducción en mecanismos reguladores del sistema inmune en los ratones TORID KO, con menor expresión de la molécula inmunoreguladora CTLA-4, y menor expresión de FoxP3, CCL22 y CCL5, lo cual probablemente lleve a una menor cantidad de células T reguladoras.

Por otro lado, la evaluación de la expresión de estas moléculas en el tumor por PCR cuantitativa solo reveló diferencias significativas entre los tumores de ratones TORID KO y WT para la molécula C/EBP β (Figura 10). El factor de transcripción C/EBP β es crítico para el microambiente inmunosupresivo y tolerogénico creado por los tumores, así como para la angiogénesis. Por lo tanto, nuevamente los resultados sugieren una disminución en la inmunosupresión, tanto a nivel del ganglio que drena el tumor como a nivel del microambiente tumoral.

Hasta aquí evaluamos diferencias en la expresión del ARN mensajero de diferentes moléculas. El siguiente paso fue evaluar la presencia de diferentes poblaciones celulares en el infiltrado tumoral.

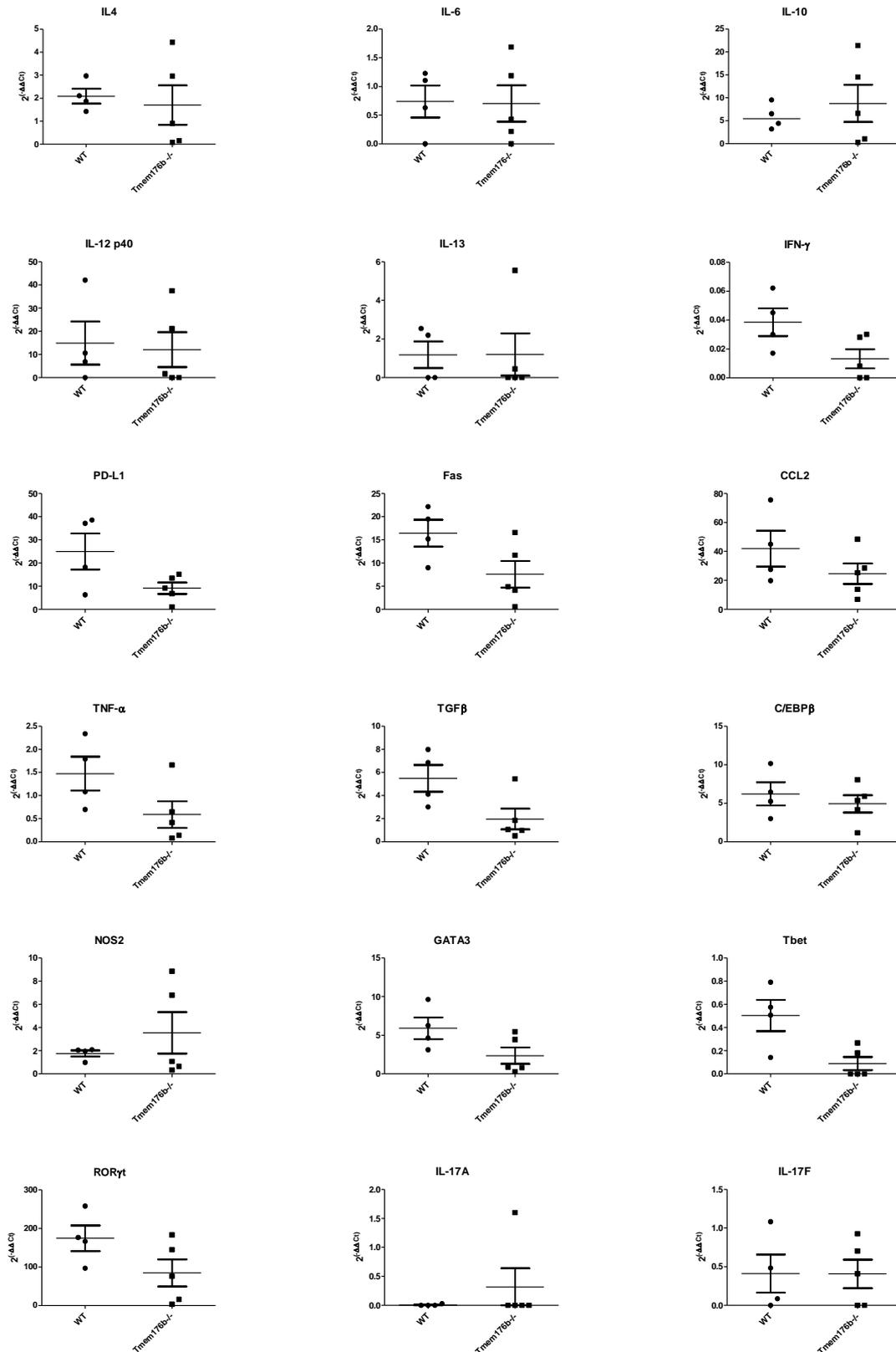


Figura 8. Expresión relativa de diferentes moléculas en el ganglio drenante del tumor por PCR cuantitativa. No se encontró diferencia significativa en la expresión relativa de IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 p40, IL-13, IFN- γ , PD-L1, Fas, CCL2, TNF- α , TGF- β , C/EBP β , NOS2, GATA3, Tbet, ROR γ t, IL-17A ni IL-17F. La expresión la diferentes moléculas en cada muestra fue normalizada con la expresión de GAPDH y expresada en función a su expresión relativa contra el calibrador (esplenocitos activados).

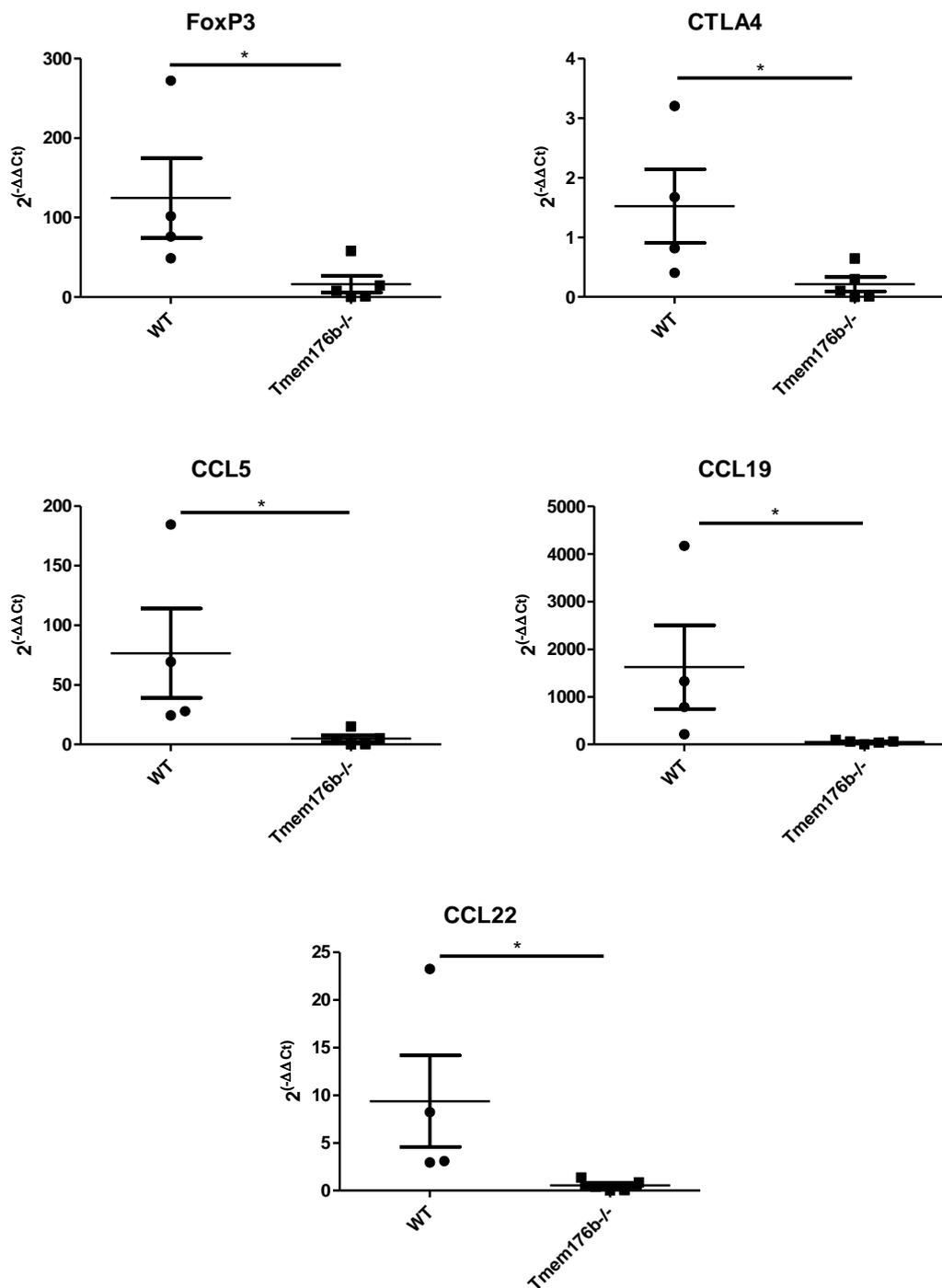


Figura 9. Expresión relativa de FoxP3, CTLA-4, CCL5, CCL19 y CCL22 en el ganglio drenante del tumor por PCR cuantitativa. Se encontró una expresión significativamente menor de FoxP3 ($p= 0.0317$), CTLA-4 ($p= 0.0317$), CCL5 ($p= 0.0159$), CCL19 ($p= 0.0159$) y CCL22 ($p= 0.0159$) en el ganglio drenante del tumor de los ratones Tmem176b-/- que los WT. La expresión la diferentes moléculas en cada muestra fue normalizada con la expresión de GAPDH y expresada en función a su expresión relativa contra el calibrador (esplenocitos activados). * $p<0.05$

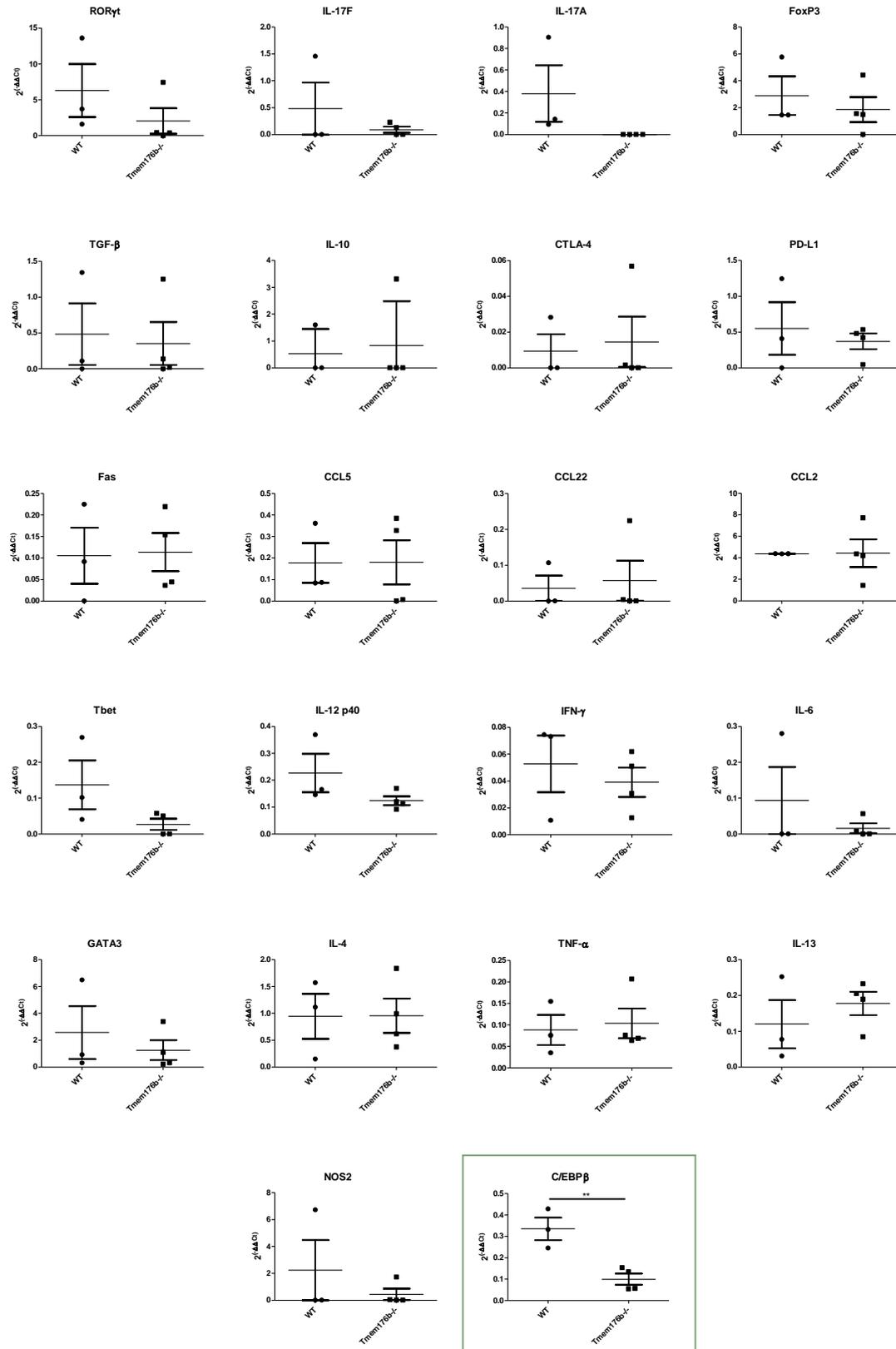


Figura 10. Expresión relativa de diferentes moléculas en el tumor por PCR cuantitativa. Se analizó por PCR cuantitativa la expresión relativa de IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 p40, IL-13, IFN- γ , PD-L1, Fas, CCL2, TNF- α , TGF- β , CEBPB, NOS2, GATA3, Tbet, ROR γ t, IL-17A, IL-17F, FoxP3, CTLA-4, CCL5 y CCL22. No se encontró diferencia significativa en la expresión relativa de la mayoría de estas moléculas en el tumor de ratones TORID KO y WT. La expresión de C/EBP β en el tumor de los ratones TORID KO fue

significativamente menor que en los ratones WT. La expresión de las diferentes moléculas en cada muestra fue normalizada con la expresión de GAPDH y expresada en función a su expresión relativa contra el calibrador (esplenocitos activados). ** $p < 0.01$ (t de Student)

Fenotipado del infiltrado tumoral

Dado que el microambiente tumoral es de extrema importancia para el desarrollo tumoral, y para complementar el estudio de expresión diferencial de ARNm en el tumor, evaluamos distintas poblaciones celulares presentes en el mismo. Luego de 14 días de la inyección de las células tumorales EG7 se resecó el tumor, y se generó una suspensión celular a través de la digestión con colagenasa. Dichas células se marcaron para citometría de flujo. Dado que la línea celular EG7 es una línea de linfoma tímico, la identificación de las células T infiltradoras de las células T tumorales podría ser un problema. Sin embargo, las células EG7 derivan de un clon de linfocito T cuyo receptor de linfocito T (TCR) está compuesto por el segmento génico $V\beta 12$ (Figura 11A). Por lo tanto, marcando a las células obtenidas de la disgregación del tumor con un anticuerpo anti-TCR $V\beta 12$ es posible identificar a las células tumorales (TCR $V\beta 12^+$) de las células infiltradoras (TCR $V\beta 12^-$) (Figura 11B). Utilizando esta estrategia analizamos el infiltrado tumoral de tumores resecados 14 días luego de la inoculación de las células tumorales (Figura 11B). No encontramos diferencia significativa en el porcentaje de células infiltradoras del tumor entre los ratones WT y TOR1D KO (Figura 11C).

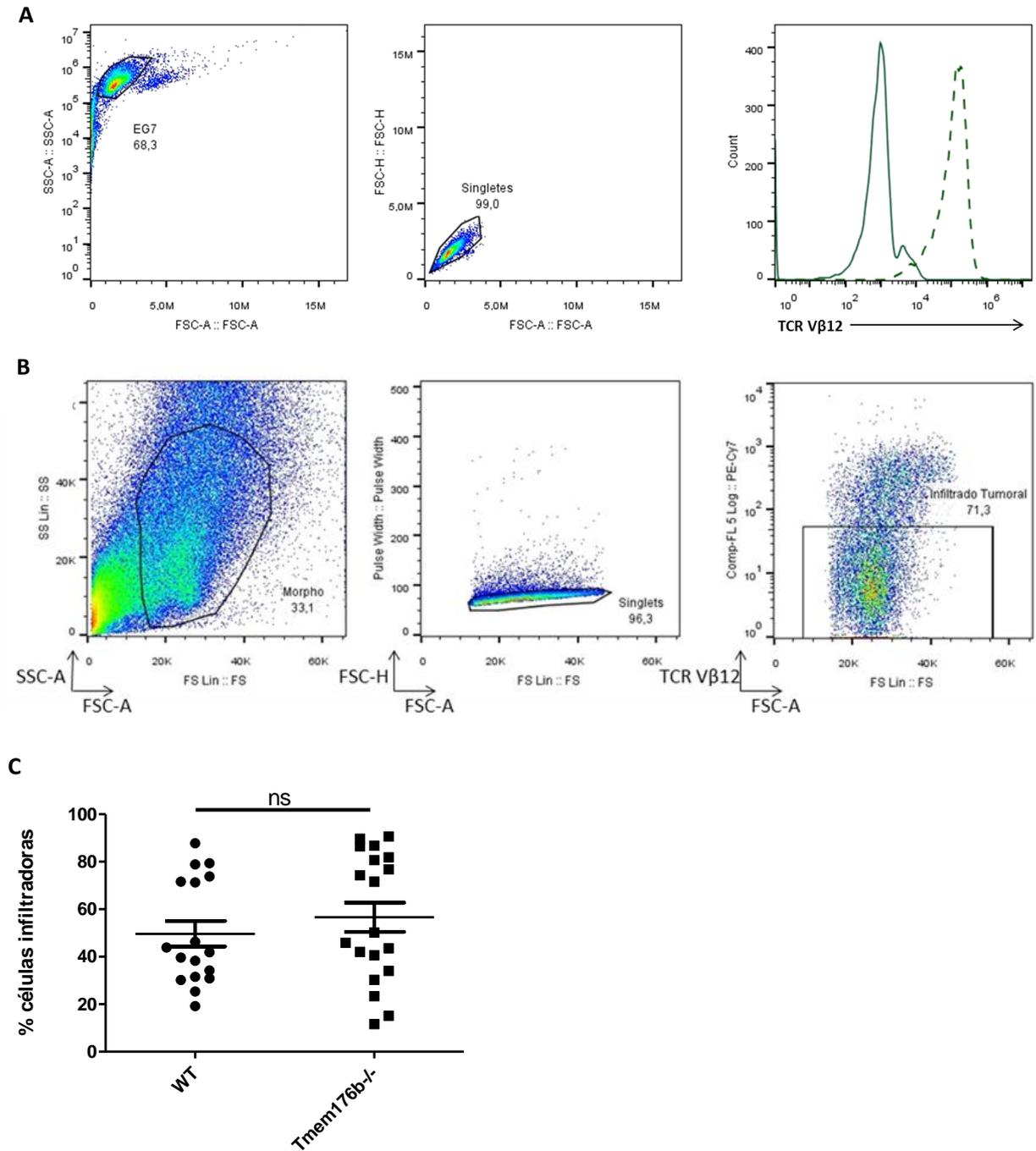


Figura 11. Identificación de células infiltradoras del tumor. Células EG7 se marcaron con anti-TCR Vβ12 y se adquirieron en citómetro de flujo. Se seleccionaron las células EG7 por su morfología, se seleccionaron los singletes, y de estos últimos se evaluó la presencia de células TCR Vβ12 positivas. La línea entera corresponde a células EG7 sin marcar, mientras que la línea punteada a células EG7 marcadas con anti-TCR Vβ12. Casi el 100 % de las células EG7 expresan el TCR con el segmento génico Vβ12 (A). 14 días luego de la inyección subcutánea de las células EG7 a ratones se reseco el tumor y se marcó con anticuerpos anti-TCR Vβ12, se seleccionaron células con una morfología amplia, se seleccionaron los singletes, y de estos últimos se evaluó la presencia de células TCR Vβ12 positivas (B), no encontrándose diferencia en el porcentaje de células infiltradoras (TCR Vβ12) (C).

Una vez identificadas las células que infiltran el tumor, analizamos las diferentes poblaciones celulares que componen dicho infiltrado. No encontramos diferencias significativas en la cantidad de células NK ($\text{TCR}\beta^-\text{NK1.1}^+$), de células NKT ($\text{TCR}\beta^+\text{NK1.1}^+$), ni de células T CD4^+ por cada célula tumoral (Figura 12A, B y C respectivamente). En cambio se encontró un aumento significativo en la cantidad de células T CD8^+ en los tumores de los ratones TORID KO con respecto a los WT (Figura 12D). Las células EG7 expresan la proteína OVA (Figura 12E), esto nos permite estudiar las respuestas desarrolladas específicamente contra el tumor. Cuando evaluamos la presencia de células T CD8^+ específicas del tumor, más específicamente de OVA, mediante el uso de pentámeros MHC-I-OVA, encontramos que habían significativamente más células $\text{TCR}\beta^+\text{CD8}^+$ específicas de OVA en los tumores de los ratones TORID KO que en los WT (Figura 12F). Lo que sugiere un aumento en mecanismos anti-tumorales mediados por células T citotóxicas en los ratones TORID KO.

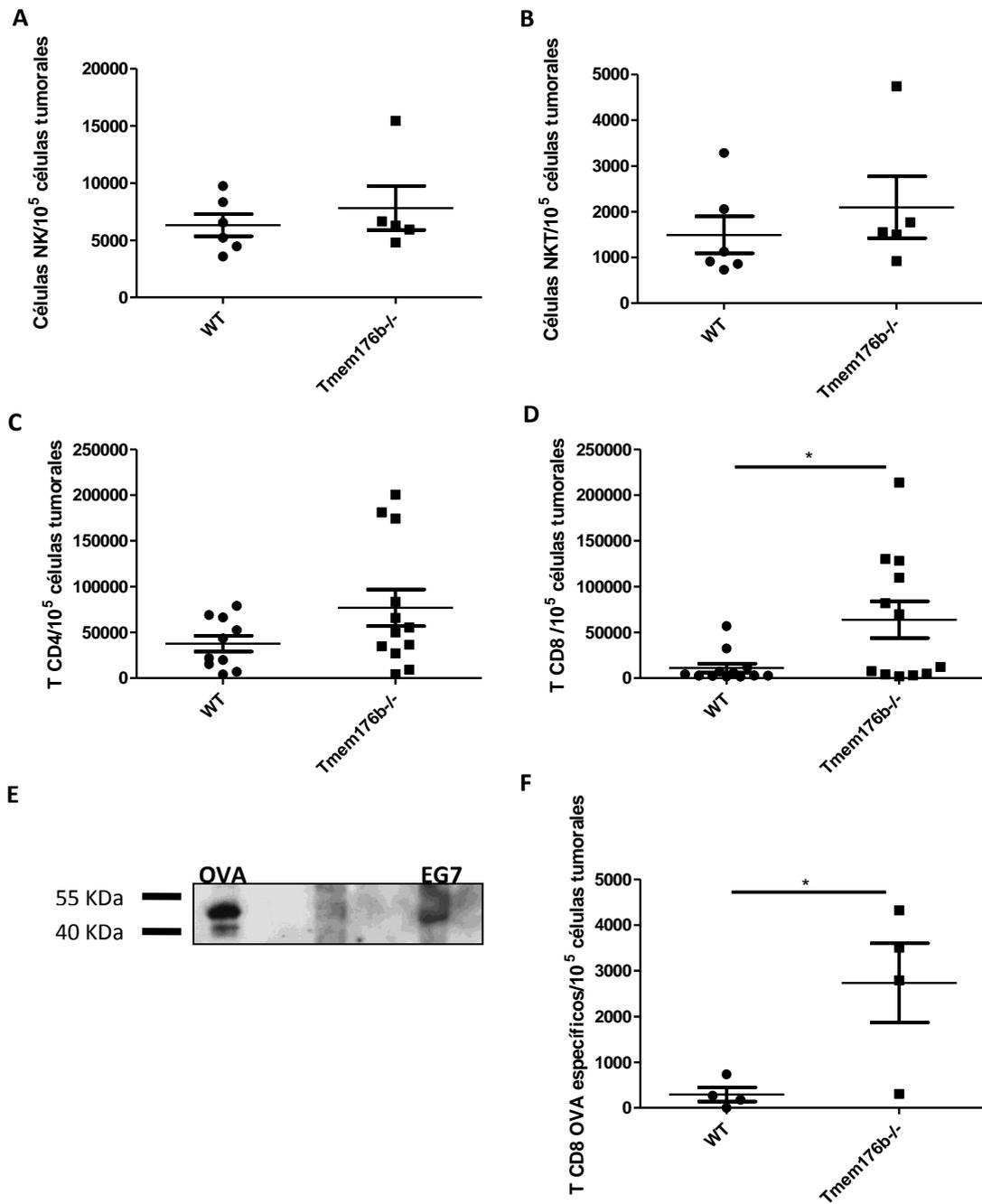


Figura 12. Identificación de diferentes poblaciones celulares en el infiltrado tumoral. No se encontraron diferencias significativas en la cantidad de células NK (A), NKT (B) ni T CD4⁺ (C) cada 10⁵ células tumorales. Los tumores de los ratones TORID KO contenían significativamente más células T CD8⁺ cada 10⁵ células tumorales que los tumores de los ratones WT (D). Por Western Blot evidenciamos la expresión de OVA por las células EG7 (E). Utilizando pentámeros MHC-I-OVA encontramos significativamente un mayor número de células T CD8⁺ específicas de OVA cada 10⁵ células tumorales en los tumores de los ratones TORID KO que en los de los WT (F). * p<0.05

Sorprendentemente, cuando evaluamos la presencia de células T reguladoras (TCD4⁺FoxP3⁺) habían más células Treg en los tumores de los ratones TORID KO que en los WT

(Figura 13A). Sin embargo, cuando evaluamos el cociente entre células efectoras T CD8⁺ y células Treg, lo cual es fisiológicamente más relevante que las poblaciones independientes, encontramos un cociente aumentado en los tumores de los ratones TORID KO (Figura 13B). Por lo tanto, en los tumores de los ratones TORID KO habría más células efectoras por cada célula T reguladora que en los tumores de los ratones WT.

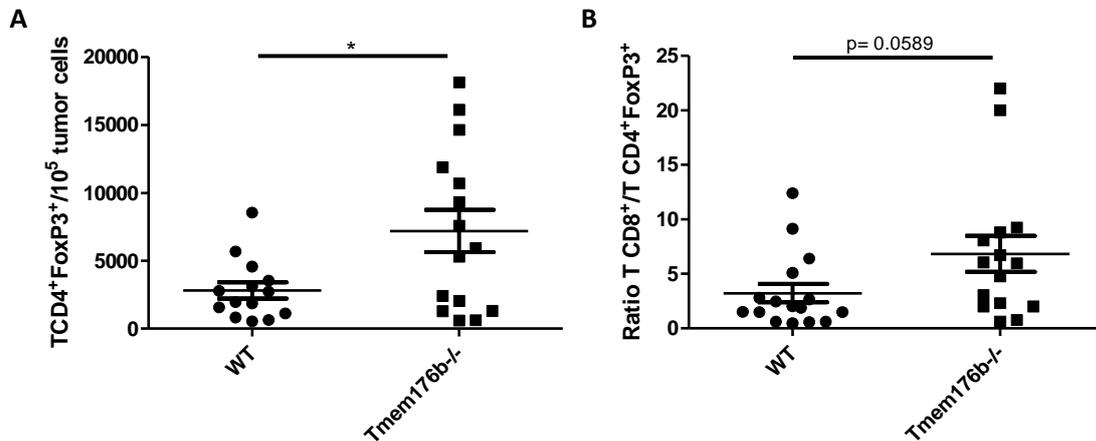


Figura 13. Identificación de células T reguladoras en el infiltrado tumoral. Los tumores de los ratones de TORID KO contenían significativamente más células T CD4⁺FoxP3⁺ que los tumores de los ratones WT (A). El ratio T CD8⁺/T CD4⁺FoxP3⁺ en los tumores de los ratones TORID KO era mayor (aunque no significativo) que en los WT (B). *p<0,05

Siguiendo con la caracterización de poblaciones linfoides en el tumor, evaluamos la presencia de células Th17. Encontramos una tendencia a una mayor cantidad de células T CD4⁺RORγt⁺ por cada célula tumoral en los tumores de los ratones TORID KO que en los WT (Figura 14).

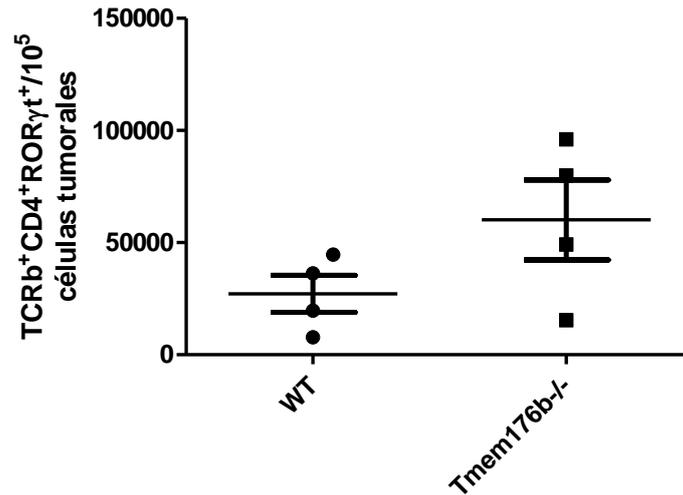


Figura 14. Células Th17 en el infiltrado tumoral. Se identificaron en el infiltrado tumoral (células TCR V β 12⁺) las células Th17 como las células TCRb⁺CD4⁺RORyt⁺. Aunque análisis estadísticos no revelaron una diferencia significativa entre los grupos, hay una tendencia a mayor cantidad de células Th17 por célula tumoral en los ratones TORID KO que en los WT.

En la diferenciación de las células Th17, la citoquina IL-1 β tiene un rol determinante. A su vez, esta citoquina puede inducir la re-programación de las células Treg a células Th17. Dada la importancia de esta citoquina y de la IL-18 (otra citoquina generada por la activación del inflammasoma) sobre el moldeado de la respuesta inmune adaptativa, evaluamos la activación de la caspasa-1, la cual cliva a la pro-IL-1 β y la pro-IL-18 para generar sus formas biológicamente activas. La caspasa-1 activa se detectó mediante la sonda FLICA, no encontrándose diferencia significativa en el porcentaje de células dendríticas (MHC-II⁺CD11c^{high}) FLICA⁺ en el infiltrado tumoral (Figura 15). Esto va en línea con resultados de nuestro laboratorio que no muestran diferencias en la cantidad de células FLICA positivas en cortes de tumor evaluados por microscopía confocal. Sin embargo, resultados de nuestro grupo muestran un aumento en la cantidad de células FLICA⁺ en el ganglio que drena el tumor, tanto por citometría de flujo como por inmunofluorescencia.

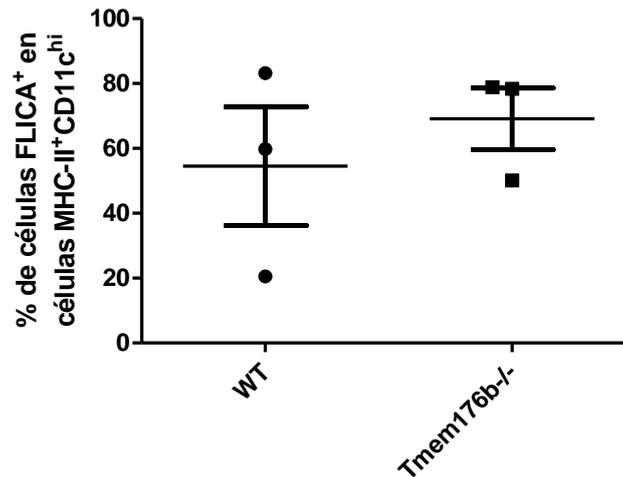


Figura 14. Detección de caspasa-1 activa en el infiltrado tumoral. En el infiltrado tumoral (células TCR V β 12⁻) se identificaron a las células dendríticas como las células MHC-II⁺CD11c^{high}. No se observó diferencia significativa en el porcentaje de células MHC-II⁺CD11c^{hi} conteniendo caspasa-1 activa (FLICA⁺) en el infiltrado tumoral de ratones TORID KO y WT.

Estudio del rol de Tmem176B en la activación del inflammasoma NLRP3

Debido a que TORID es un canal iónico podría, al modular la movilización iónica, regular la activación del inflammasoma NLRP3. Para probar esta hipótesis evaluamos la activación del inflammasoma NLRP3, tanto *in vitro* en células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDCs) de ratones TORID KO y WT, así como *in vivo* en ratones TORID KO y WT. Al día 8 del cultivo de las BMDCs estas se estimularon durante 3h con 0.25 μ g/mL de LPS (primera señal) y luego se estimularon con diferentes activadores conocidos del inflammasoma NLRP3 (segunda señal). Estos fueron, ATP (0.5 mM), nigericina (2.5 mM) e hidróxido de aluminio (500 μ g/mL). Todos estos activadores del inflammasoma NLRP3 llevaron a una mayor producción de la citoquina IL-1 β por las BMDCs TORID KO que las WT evaluada por ELISA (Figura 16A). Mediante Western Blot de IL-1 β evidenciamos que este aumento en la concentración de IL-1 β era dado por un aumento en la forma activa de 17 KDa, y no por un aumento en la pro-IL-1 β de 37 KDa (Figura 16B).

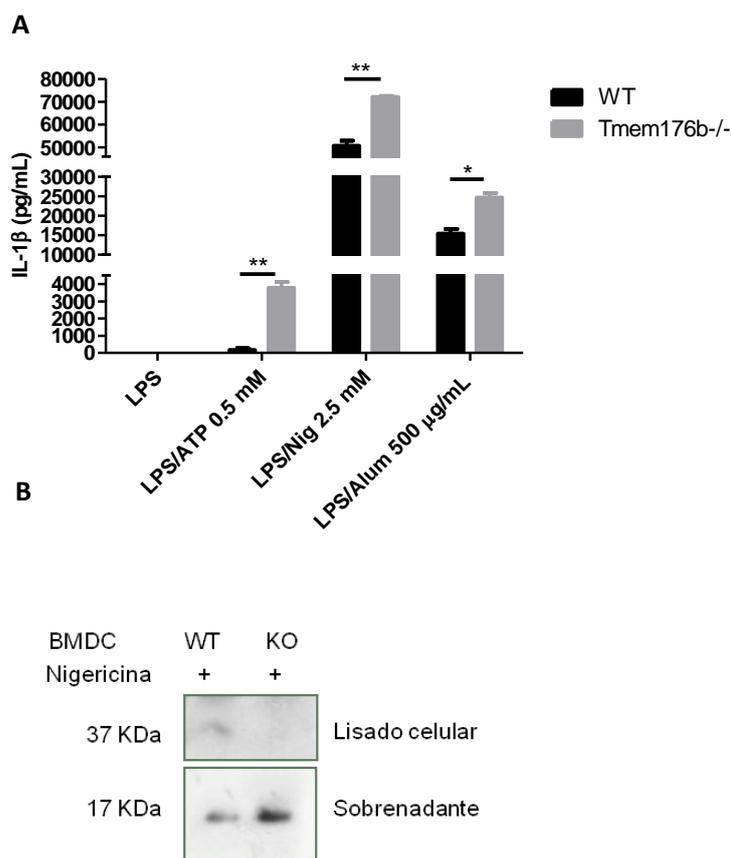


Figura 16. Estimulación del inflamasoma NLRP3 en BMDCs *Tmem176b*^{-/-} y WT. Se estimularon BMDCs TORID KO y WT con 0.25 µg/mL de LPS durante 3h, y luego con 0.5 mM de ATP, 2.5 mM de nigericina o 500 µg/mL de hidróxido de aluminio durante 2 horas. Se determinó la concentración de IL-1β en el sobrenadante, encontrándose mayor producción en las BMDCs TORID KO que las WT para todos los activadores (A). Western Blot de IL-1β del lisado celular y del sobrenadantes de las BMDC estimuladas con 2.5 mM de nigericina. Se observa un aumento en la forma activa de la IL-1β (17 KDa) en el sobrenadante de las BMDCs TORID KO (B).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de la estimulación *in vitro* de BMDCs nos preguntamos si lo mismo sucedía *in vivo*. La evaluación de la activación del inflamasoma *in vivo* se realizó a través del reclutamiento de neutrófilos dependiente de IL-1β. Para eso inyectamos intraperitonealmente hidróxido de aluminio, activador del inflamasoma NLRP3, y evaluamos el reclutamiento de neutrófilos al peritoneo. Identificamos a los neutrófilos como la población CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁺ (Figura 17A). Encontramos que los ratones TORID KO presentan un mayor reclutamiento de neutrófilos que los ratones WT (Figura 17B), por lo tanto en estos ratones se da una mayor producción de IL-1β que en los ratones WT. Entonces, estos resultados muestran que TORID inhibe al inflamasoma NLRP3 tanto *in vitro* como *in vivo*.

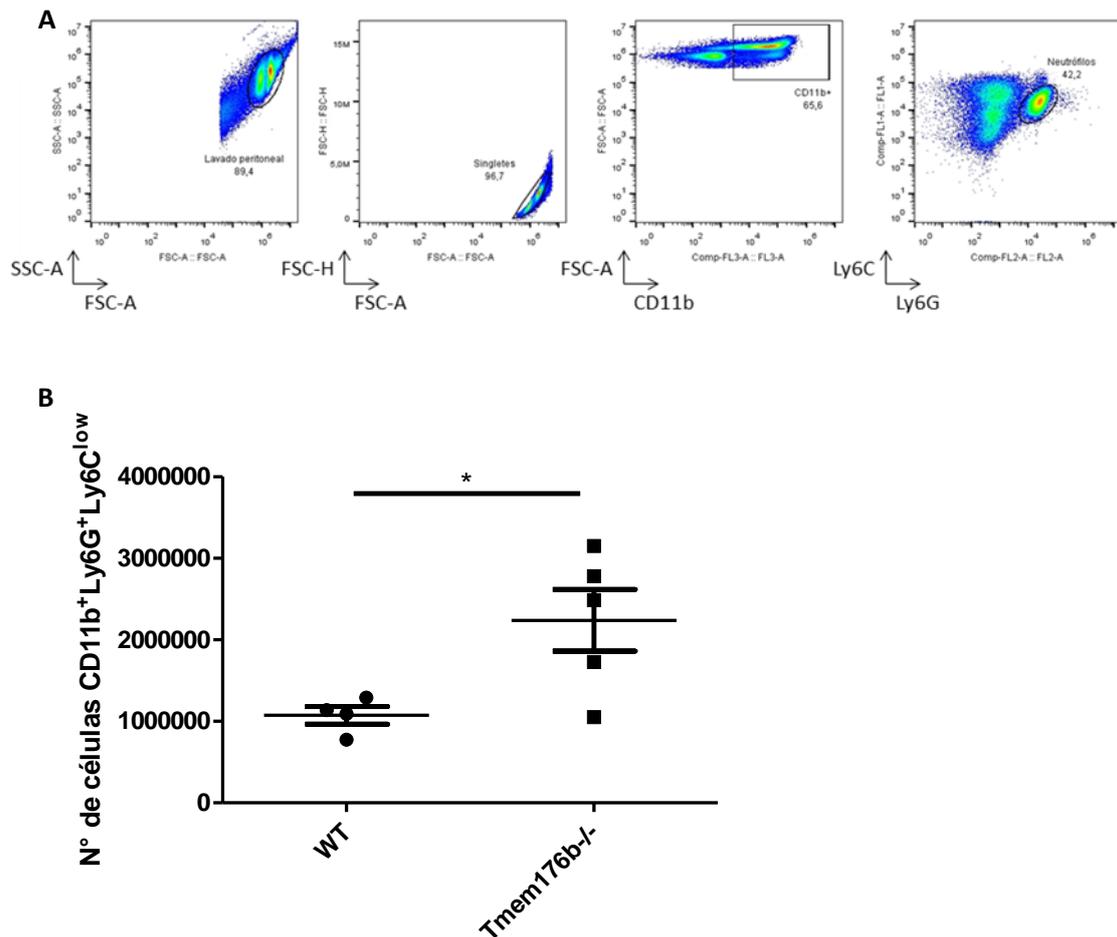


Figura 17. Evaluación de la activación del inflammasoma NLRP3 in vivo. Se inyectaron ratones intraperitonealmente con 25 μ g de hidróxido de aluminio en 200 μ L, luego de 16h se les realizó un lavado peritoneal y se contaron los neutrófilos (CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁺) (A). Se observó un mayor reclutamiento de neutrófilos al peritoneo de los ratones TORID KO comparados con los WT (B). * $p < 0.05$

III. Caracterización electrofisiológica de Tmem176B y Tmem176A

Con el objetivo de caracterizar las propiedades electrofisiológicas de TORID y Tmem176A, de aquí en más HCA112, transfectamos células CHO con TORID-GFP y HCA112-mCherry. Tanto TORID como HCA112 son proteínas de membranas intracelulares, y para poder realizar estudios de “whole cell patch clamp” es necesario que los canales se encuentren en la membrana plasmática. Por microscopía confocal evidenciamos que el tratamiento con PMA (100 nM), un activador de la Proteína Quinasa C (PKC), provocó la re-localización de HCA112 a la membrana plasmática como ya había sido reportado (Segovia et al. 2014) (Figura 18 A-B).

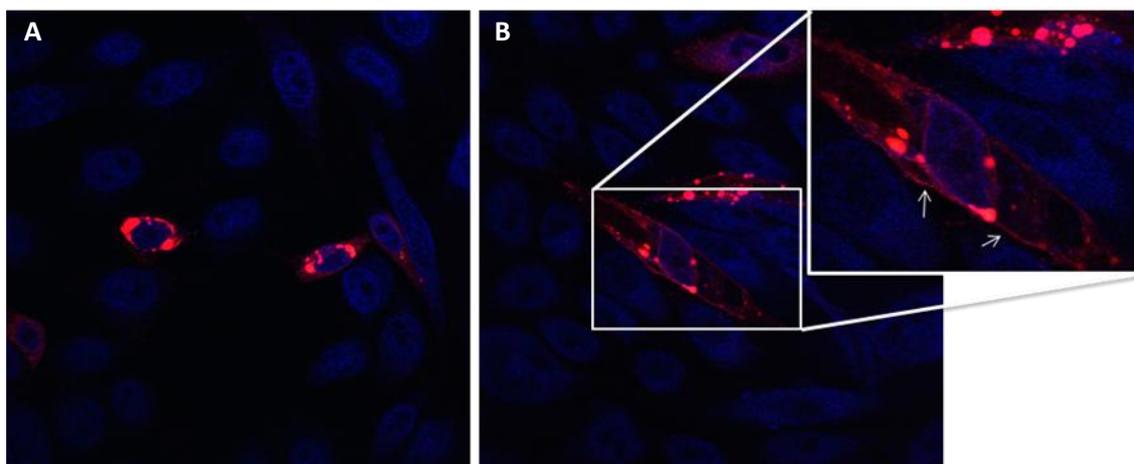


Figura 18. Re-localización de Tmem176A a la membrana plasmática. En células CHO transfectadas con Tmem176A-mCherry, dicha proteína se encuentra expresada en vesículas intracelulares (A). Luego del tratamiento con PMA 100 nM se observa la re-localización de Tmem176A-mCherry a la membrana plasmática, indicado con flechas (B). Azul: DAPI, Rojo: mCherry.

Luego de 24 horas de la transfección se procedió a realizar registros de “patch clamp”, identificando a las células transfectadas por la fluorescencia de GFP y mCherry (Figura 19A). La pipeta de “patch” fue cargada con solución intracelular a la cual se le agregó 100 nM de PMA con el fin de inducir la re-localización de TORID-GFP y HCA112-mCherry a la membrana plasmática por activación de la PKC (Feigenspan & Bormann 1994).

Luego de 5 min desde que se obtuvo acceso al interior celular se procedió a registrar a las células en condiciones basales, y cuando se le aplicaba un “puff” de ácido (pH5). El cambio en el pH extracelular de 7.3 a 5 provocó en las células transfectadas una corriente entrante cercana a -140 pA cuando se las mantuvo a un potencial de mantenimiento de -70 mV (Figura 19B). El pico de la corriente se registró aproximadamente 700 ms luego del cambio del pH a 5. A pesar de mantenerse el pH a 5, la corriente disminuyó, lo que indicaría una desensibilización del canal. Esta corriente no se observó en células no transfectadas, ni en células transfectadas no tratadas con PMA (Figura 19B). Mediante un protocolo de escalones de voltaje (-100 mV a +40 mV) se determinó la relación corriente-voltaje. El potencial de reversión de la corriente observada fue cercana a -20 mV. Este potencial no coincide con el potencial de equilibrio de

ninguna especie iónica, por lo tanto sugiere que TORID y HCA112 son canales catiónicos no selectivos (Figura 19C-D). También probamos utilizar células HEK293 como sistema de expresión de TORID y HCA112, pero decidimos no utilizar estas células ya que encontramos que expresan canales endógenos sensibles al ácido, particularmente ASIC1a (Gunthorpe et al. 2001), lo que dificulta el análisis de los resultados obtenidos.

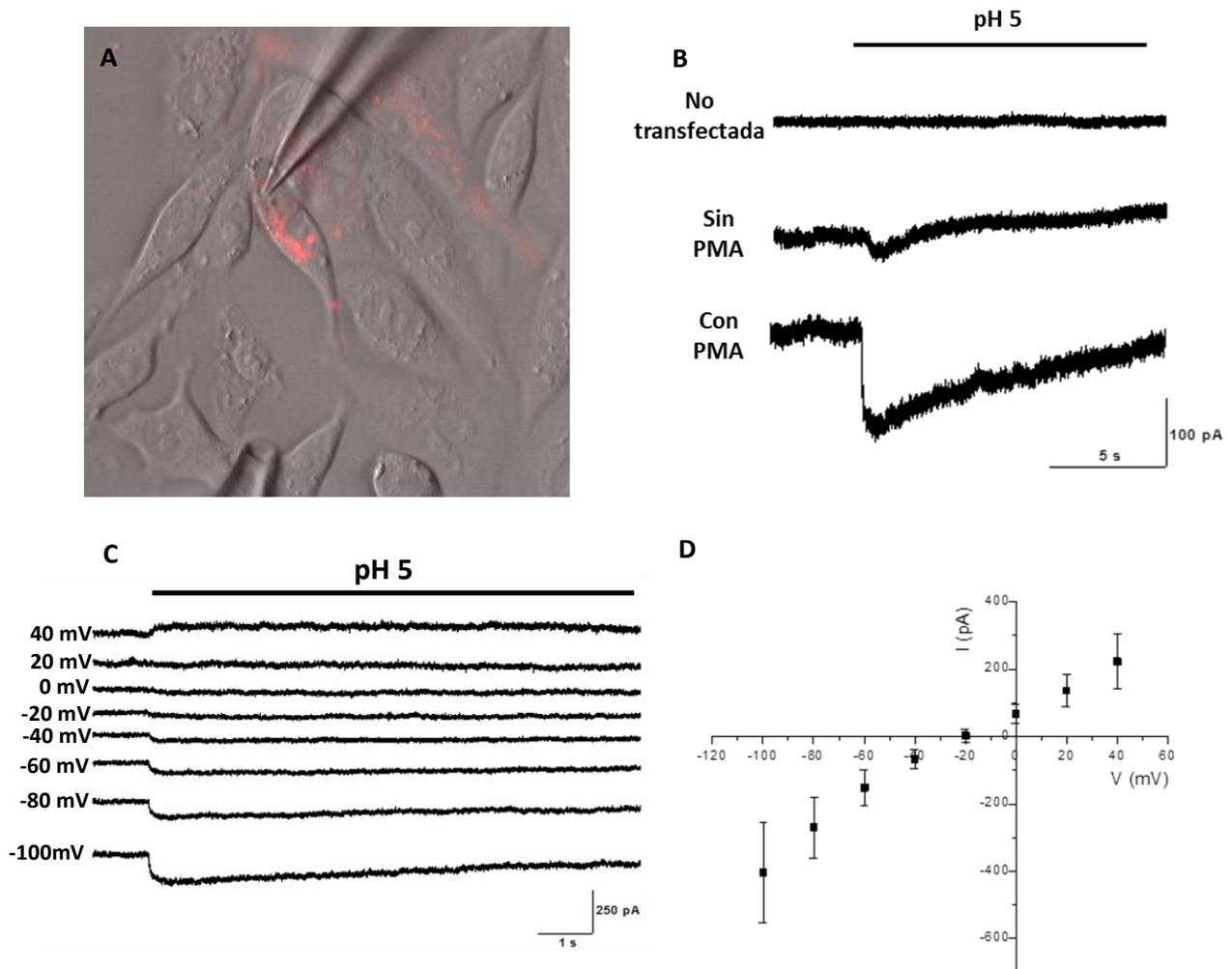


Figura 19. Registro de patch clamp en configuración "whole cell" de células CHO. (A) Imagen fusionada de luz transmitida y epifluorescencia de células CHO. La pipeta superior corresponde a la pipeta de registro, mientras que la pipeta inferior corresponde a la de "puff", la cual fue cargada con solución extracelular a pH5. (B) Se registraron células CHO transfectadas con Tmem176b y Tmem176a, con o sin PMA en la pipeta de "patch", y células CHO no transfectadas como control. El potencial de mantenimiento fue de -70 mV. El cambio en el pH extracelular de 7.3 a 5, generó una corriente entrante (-140 pA) en las células transfectadas tratadas con PMA. (C) Registro de la corriente generada por el ácido a diferentes potenciales de mantenimiento. (D) Curva de intensidad de corriente a diferentes voltajes. La corriente entrante generada por el ácido se revierte a un potencial cercano a -20 mV, n=5.

IV. Estudio de canales iónicos en la activación del inflamasoma NLRP3

La movilización de iones parece ser determinante en la activación del inflamasoma NLRP3. De los resultados expuestos anteriormente se desprende que la modulación de la activación del inflamasoma puede constituir una nueva terapia anti-tumoral. Por lo tanto, algunos canales iónicos podrían constituir otro blanco molecular para modular las respuestas anti-tumorales. Con el fin de identificar estos canales evaluamos el efecto de un panel de inhibidores y activadores de diferentes canales iónicos en la activación del inflamasoma (Tabla 2). Para ello generamos células dendríticas derivadas de la médula ósea, y luego de 8 días en cultivo las estimulamos con LPS (como primera señal de activación del NLRP3) durante 3 horas, se lavaron y se incubaron con los distintos inhibidores y activadores de canales iónicos por 30 minutos y luego se les agregó ATP (como segunda señal de activación del NLRP3). Al evaluar por ELISA la producción de IL-1 β en cada uno de los casos encontramos que varios fármacos eran capaces de alterar la activación del inflamasoma NLRP3 (Figuras 20, 21, 22).

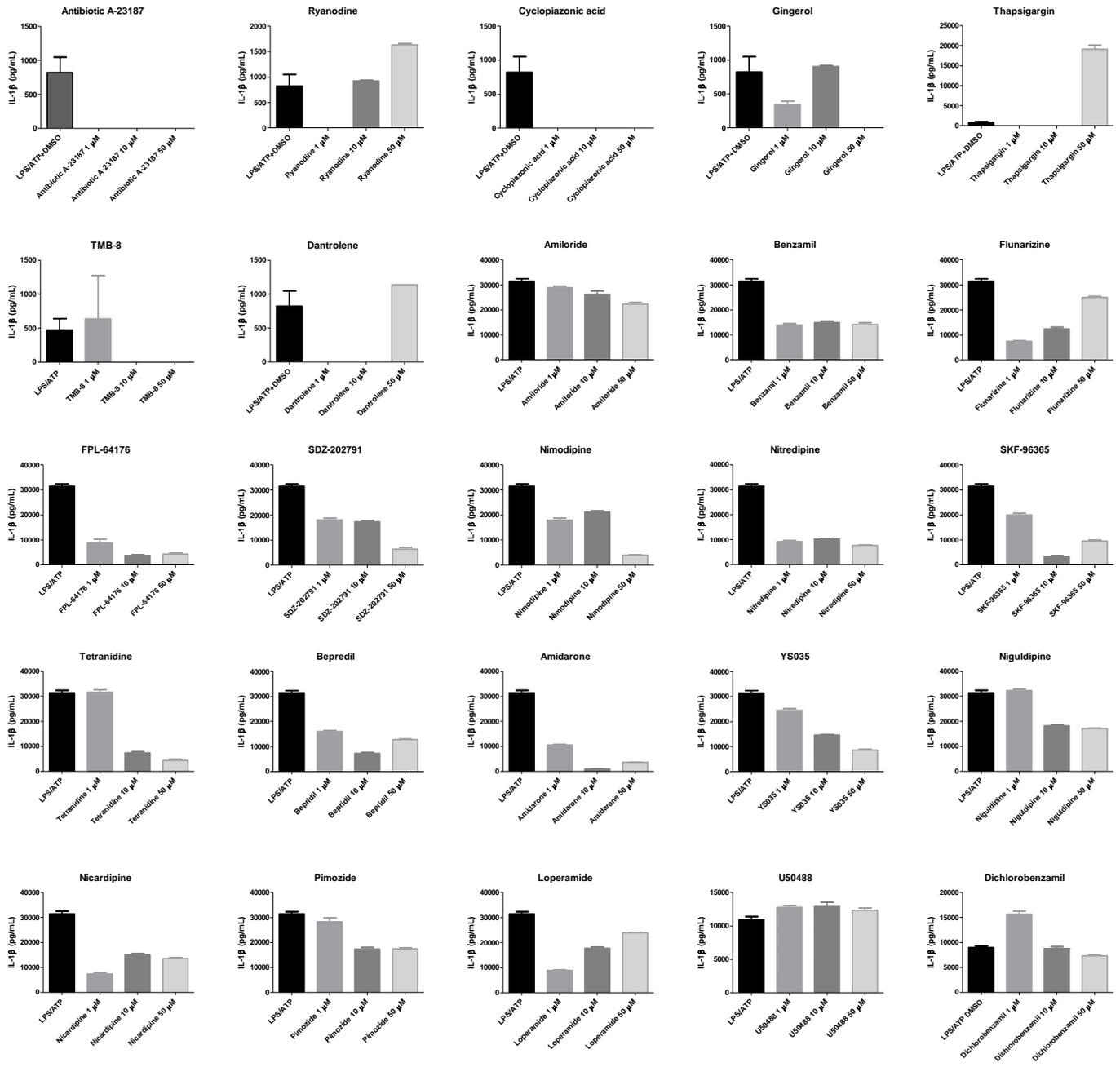


Figura 20. Estudio de moduladores de canales de calcio en la activación del NLRP3. Varios inhibidores y activadores de canales de calcio fueron evaluados. Muchos de los inhibidores provocaron una disminución en la producción de IL-1 β , mostrando la importancia de los iones calcio en la activación del NLRP3.

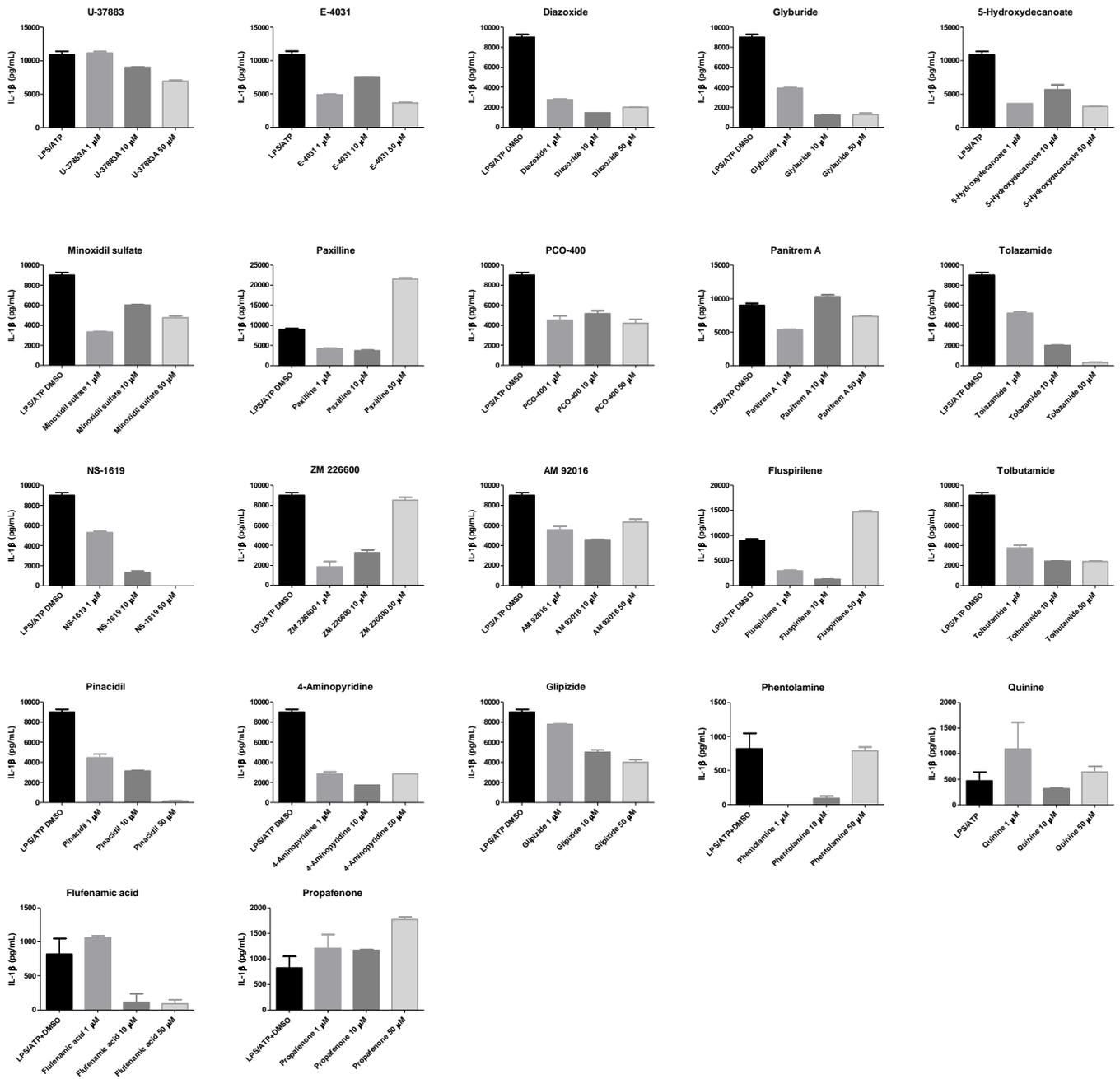


Figura 21. Estudio de moduladores de canales de potasio en la activación del NLRP3. Al igual que lo que sucede con el calcio, la inhibición de canales de potasio, por ejemplo con glyburide, llevó a una disminución en la producción de IL-1 β .

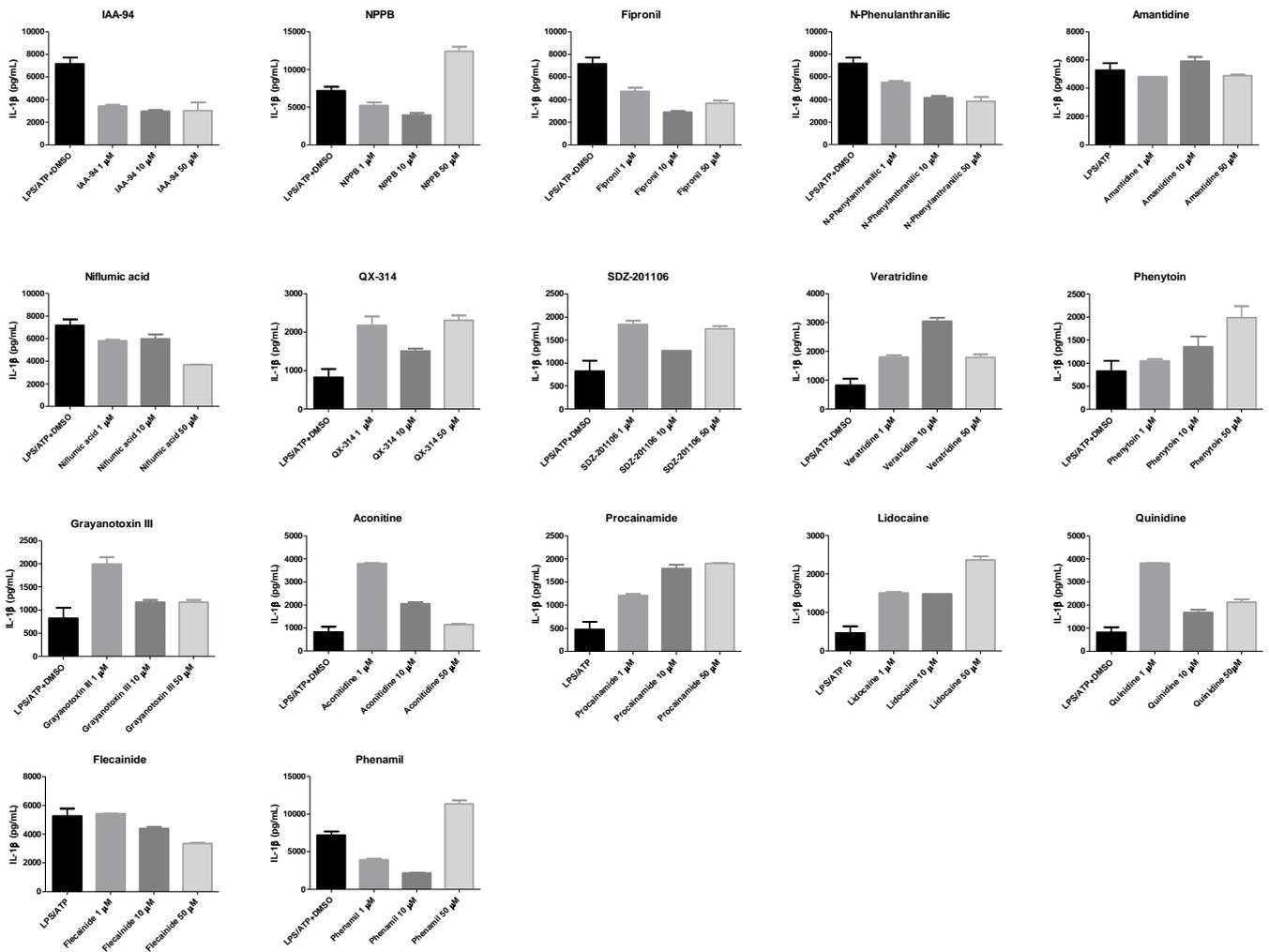


Figura 22. Estudio de moduladores de canales misceláneos y de sodio en la activación del NLRP3. El efecto de los iones sodio en la activación del inflamasoma no queda claro, tanto inhibidores (por ejemplo procainamida o lidocaina) como activadores (por ejemplo aconitina o veratridina) de canales de sodio son capaces de aumentar la producción de IL-1 β .

Dentro de los fármacos que observamos que eran capaces de modular al inflamasoma NLRP3 se encontró un grupo que tienen como blanco canales de calcio de tipo L. Los inhibidores de estos canales (diltiazem, nifedipina y verapamil) fueron capaces de inhibir la activación del NLRP3 (Figura 23A). Por otro lado, un activador de los canales de calcio tipo L (BAY K-8644) fue capaz de aumentar la producción de IL-1 β por BMDCs estimuladas con ATP (Figura 23A). De hecho, el BAY K-8644 fue capaz de activar al inflamasoma en ausencia de segunda señal, por lo que el aumento en el calcio intracelular fue suficiente para desencadenar la activación del NLRP3 (Figura 23A). Los resultados obtenidos por ELISA se confirmaron por

Western Blot, observándose una menor producción de la forma activa de IL-1 β (17 KDa) por las BMDCs tratadas con diltiazem, nifedipina y verapamil (Figura 23C). Por otro lado, se observó una mayor producción de la forma activa de IL-1 β por las BMDCs tratadas con BAY K-8644, incluso en ausencia de ATP (Figura 23C). Con el objetivo de entender el mecanismo por el cual BAY K-8644 activa al inflamasoma NLRP3, realizamos las estimulaciones de BMDCs en medio con concentración normal de potasio (5 mM), así como en un medio con alta concentración de potasio (140 mM). En la condición con medio alto en potasio no ocurren corrientes de potasio, ya que el potencial de equilibrio para este ión es 0. El eflujo de potasio, como es conocido, es determinante para la activación del NLRP3 por el ATP (Figura 23B y D). En cambio, la activación por el BAY K-8644 no se inhibe completamente por el alto K⁺ extracelular (Figura 23B y D). Entonces, puede ser que la entrada de Ca²⁺ active canales de K⁺ y que el eflujo de K⁺ sea lo que active al inflamasoma. Sin embargo, hay que tener en cuenta que al aumentar la concentración de K⁺ extracelular estamos despolarizando la membrana plasmática, llevándola a un potencial cercano a 0 (potencial de reposo del K⁺). Esta despolarización hace que la fuerza electromotriz para el Ca²⁺ disminuya, dándose una menor entrada de Ca²⁺. La entrada de Ca²⁺ podría ser suficiente para la activación del inflamasoma NLRP3, explicándose la menor producción de IL-1 β en la condición de alta concentración extracelular de K⁺ por una disminución en la entrada de Ca²⁺ debido a la disminución en la fuerza electromotriz de este ion.

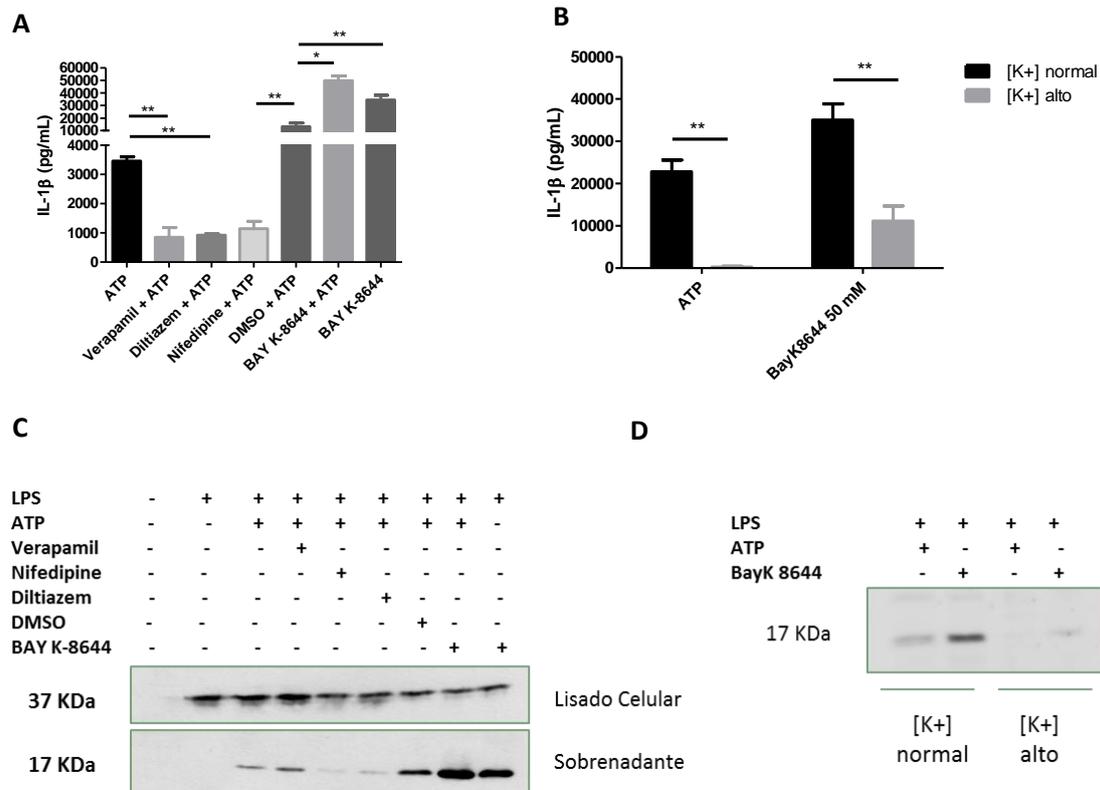


Figura 23. Efecto sobre la activación del NLRP3 de la modulación de canales de calcio de tipo L. Células dendríticas derivadas de la médula ósea se estimularon con LPS y luego con verapamil 50 μ M+ATP 0,5 mM, nifedipine 50 μ M +ATP 0,5 mM, diltiazem 50 μ M +ATP 0,5mM, DMSO 0,5% +ATP 0,5 mM, BAY K-8644 50 μ M +ATP 0,5 mM o BAY K-8644 50 μ M. Por ELISA para IL-1 β encontramos una menor producción de esta citoquina con los inhibidores de los canales de calcio de tipo L, así como un aumento con el activador de estos canales (A). Por Western Blot para IL-1 β confirmamos que la disminución o el aumento en IL-1 β era debida a la forma activa (17 KDa) de dicha citoquina (C). Células dendríticas derivadas de la médula ósea se estimularon con LPS y luego con ATP o BAY K-8644 en condiciones de concentración extracelular de K⁺ normal o elevado. El aumento de K⁺ extracelular inhibe completamente la activación del NLRP3 por el ATP, mientras que parcialmente por el BAY K-8644 (B y D).

Discusión

El estudio de moléculas reguladoras del sistema inmune en diferentes enfermedades ha tomado gran importancia en los últimos años. Particularmente, el estudio de moléculas inmunoreguladoras en el cáncer llevó al desarrollo de nuevas inmunoterapias para el tratamiento del mismo. Ejemplos de esto son el Ipilimumab, un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4, el pembrolizumab y nivolumab, dos anticuerpos anti-PD-1, aprobados para el tratamiento del melanoma metastásico. En esta tesis se estudió a Tmem176B (también conocido como TORID, una nueva molécula asociada con la regulación de la respuesta inmune) en las respuestas inmunes anti-tumorales.

Encontramos que los ratones deficientes en TORID inyectados con células tumorales mostraban un menor crecimiento tumoral, así como una mejor supervivencia, que los ratones WT. Por lo tanto, nos preguntamos qué mecanismos inmunológicos eran responsables de estas diferencias. Para intentar contestar esto estudiamos tanto el ganglio que drena el tumor como el microambiente tumoral, el cual es de extrema importancia ya que determinar la eficacia de la respuesta inmune anti-tumoral.

Evaluamos la expresión de diferentes moléculas, relacionadas a las respuestas inmunes, en el ganglio drenante y en el tumor por qRT-PCR. En el ganglio drenante del tumor de ratones TORID KO encontramos una menor expresión en FoxP3, CTLA-4, CCL5, CCL19 y CCL22 que en los WT. El factor de transcripción FoxP3 guía la diferenciación de células T CD4⁺ a células T reguladoras. Estas células inhiben la respuesta inmune a través de diferentes mecanismos, por lo cual en el contexto tumoral promueven la progresión del tumor. La molécula inhibidora CTLA-4 es expresada por células T reguladoras, así como por células T activadas. Esta molécula se une a B7 (CD80/86) por lo que compite con CD28 por la unión a B7. De esta forma, priva a las células T de la señal co-estimuladora necesaria para su activación. Por lo tanto, los ratones TORID KO presentan a nivel del ganglio drenante una reducción en

mecanismos reguladores, menor expresión de FoxP3, que podría indicar reducción en la cantidad de células T reguladoras, y menor expresión de CTLA-4, y por lo tanto presumiblemente mayor activación de células T. A su vez, también encontramos menor expresión de CCL22 en el ganglio drenante del tumor de ratones TORID KO. La quimioquina CCL22 se une al receptor CCR4 que se expresa en células T CD4⁺FoxP3⁺, por lo tanto CCL22 es un quimioatrayente de células T reguladoras (Campbell 2015), reforzando la idea de menor inmunosupresión en los ratones deficientes en TORID. Como se mencionó anteriormente también se encontró una menor expresión de otras quimioquinas, CCL5 y CCL19, en los ratones TORID KO. La quimioquina CCL5, también conocida como RANTES, juega un rol esencial en la inflamación y en respuestas inmunes, reclutando leucocitos a sitios de inflamación. Particularmente, CCL5 recluta células T reguladoras que presentan el receptor para CCL5 (CCR5), de esta manera inhibiendo respuestas inmunes anti-tumorales (Adler et al. 2003; Tan et al. 2009). Sin embargo, la quimioquina CCL19 se ha relacionado a respuestas anti-tumorales por su capacidad de reclutar células dendríticas, de esta forma favoreciendo la interacción de las células dendríticas con células T (Jun Lu et al. 2015). Las implicancias de la reducción en la expresión de CCL19 en el ganglio que drena al tumor en los ratones TORID KO resta ser evaluada. Por lo tanto, en el ganglio que drena el tumor de ratones TORID KO hay una menor expresión de CCL22 y CCL5, los cuales reclutan células T reguladoras, lo que resultaría en una menor expresión de FoxP3 en el ganglio drenante. Esto va en línea con resultados de nuestro laboratorio que muestran por citometría de flujo una menor cantidad de células T FoxP3⁺ en el ganglio que drena el tumor.

Así como en el ganglio drenante del tumor, se evaluó la expresión de estas moléculas por qRT-PCR en el tumor, encontrándose solo una diferencia significativa entre los tumores de los ratones TORID KO y WT para la molécula C/EBPβ. El factor de transcripción C/EBPβ es crítico para microambiente inmunosupresivo y tolerogénico creado por los tumores, induciendo la diferenciación de células mieloides supresoras (Marigo et al. 2010). En un

modelo de glioblastoma se ha reportado que C/EBP β promueve la angiogénesis al aumentar la secreción de IL-6, de esta forma promoviendo la progresión tumoral (Liu et al. 2015). Nuestros resultados muestran una menor expresión de C/EBP β en el tumor de los ratones TORID KO que en los WT; es necesario confirmar si esta disminución en C/EBP β se acompaña de una disminución en IL-6. Una disminución en la angiogénesis y en el número de células mieloides supresoras en los tumores de los ratones TORID KO, debido a la disminución en la expresión de C/EBP β , podría explicar las diferencias en el crecimiento tumoral entre los dos grupos. Es necesario aumentar el número de tumores evaluados para confirmar si hay o no diferencias en la expresión de otras moléculas.

Dada la importancia del microambiente tumoral en la progresión tumoral evaluamos la presencia de diferentes poblaciones celulares en el infiltrado tumoral por citometría de flujo luego de 14 días de la inoculación de las células tumorales EG7. No encontramos diferencias significativas en el número de células NK por célula tumoral en el infiltrado de ratones TORID KO comparados con los WT. La importancia de estas células en la inmunidad anti-tumoral fue evidenciada por un aumento en la incidencia de cáncer en pacientes con baja actividad citotóxica de las células NK (Imai et al. 2000). Tampoco encontramos diferencia en un subtipo de células NKT (TCR β ⁺NK1.1⁺). Diferentes tipos de células NKT presentan diferentes efectos en la inmunidad anti-tumoral. Las células NKT tipo I, al igual que las NK, contribuyen al control de la progresión tumoral por el sistema inmune (Marrero et al. 2015; McEwen-Smith et al. 2015). Sin embargo, las células NKT de tipo II tienen funciones inmunosupresoras. Al producir IL-13, en combinación con TNF- α , estimulan a las MDSC a secretar TGF- β (Marrero et al. 2015; Izhak et al. 2013). Estos tipos de células NKT se diferencian por sus receptores de células T (TCR). Las células NKT de tipo I utilizan una cadena TCR α semi-invariante apareada con un repertorio restringido de cadenas β , mientras que las de tipo II utilizan un repertorio de TCR más diverso similar a las células T CD4⁺ y CD8⁺ (Marrero et al. 2015; McEwen-Smith et al. 2015). Dado los efectos contrarios en la inmunidad anti-tumoral de los distintos tipos de células NKT, sería

interesante evaluar la presencia de células NKT de tipo I y II en el infiltrado tumoral de ratones TORID KO y WT.

El papel clave de las células T citotóxicas es ampliamente conocido. Las células T CD8⁺ citotóxicas pueden reconocer y destruir las células tumorales. Nosotros encontramos un aumento en el número de células T CD8⁺ cada célula tumoral en el infiltrado tumoral de ratones TORID KO. A su vez, este aumento resultó en un aumento en el número de células T CD8⁺ específicas del tumor por cada célula tumoral en el infiltrado de ratones TORID KO. Por lo tanto, de alguna manera TORID afecta la infiltración de las células T citotóxicas al tumor.

Sorprendentemente, cuando evaluamos la presencia de células T reguladoras (T CD4⁺FoxP3⁺) en el infiltrado tumoral, encontramos una mayor cantidad de estas células por célula tumoral en los tumores de los ratones TORID KO que en los WT. Sin embargo, ha sido reportado un aumento en el número absoluto de células T reguladoras en órganos trasplantados que están siendo rechazados (Chauhan et al. 2009), así como una mayor expresión de FoxP3 en biopsias de riñón trasplantado rechazado (Bunnag et al. 2008). Esto muestra que el estudio de una única población, ya sea reguladora o efectora, puede llevar a conclusiones erróneas. Por lo tanto, la información que se obtiene del cociente entre las células T CD8⁺ y las células T CD4⁺FoxP3⁺ (Tefectoras/Treguladoras), es fisiológicamente más relevante. Una disminución en el cociente T CD8⁺/T CD4⁺FoxP3⁺ ha sido correlacionado con mal pronóstico para el cáncer de mama, de ovarios y gástrico (Nishikawa & Sakaguchi 2010). Al evaluar dicho cociente, encontramos que los tumores de los ratones TORID KO presentaban un mayor cociente T CD8⁺/T CD4⁺FoxP3⁺ que los tumores de los ratones WT. Por lo tanto, los tumores de los ratones deficientes en TORID muestran un mayor número de células T citotóxicas por cada célula T reguladora, lo que podría explicar el mejor pronóstico de los ratones TORID KO. Resta evaluar si hay diferencias entre los grupos en la cantidad de células T

reguladoras específicas del tumor, particularmente OVA específicas, así como si hay diferencias en su función reguladora.

La activación del inflamasoma es una función clave mediada por el sistema inmune innato. Los inflamasomas son complejos multiproteicos que se ensamblan en el citosol luego de sensor PAMPs o DAMPs para activar a la caspasa-1. La caspasa-1 activa cliva a la pro-IL-1 β y a la pro-IL-18 generando sus formas biológicamente activas. El mecanismo preciso por el cual el inflamasoma NLRP3 se activa aún es controvertido. Sin embargo, la movilización de iones, el eflujo de potasio y el incremento del calcio intracelular, se han asociado con la activación del inflamasoma NLRP3. Por lo tanto, TORID al comportarse como un canal iónico podría modular la activación del inflamasoma NLRP3. Por este motivo, evaluamos el rol de TORID en la activación del inflamasoma NLRP3 tanto *in vivo* como *in vitro*. La estimulación con diferentes activadores del NLRP3 (ATP, nigericina e hidróxido de aluminio) de células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDC) de ratones TORID KO llevó a una mayor producción de IL-1 β que en las BMDCs WT. También evaluamos la activación del inflamasoma NLRP3 *in vivo* a través de la inyección intraperitoneal de hidróxido de aluminio. La inyección intraperitoneal de hidróxido de aluminio en los ratones TORID KO generó un mayor reclutamiento de neutrófilos al peritoneo que en los ratones WT. En este modelo experimental, dicho reclutamiento de neutrófilos al peritoneo fue reportado como dependiente de la IL-1 β (Hornung et al. 2008). Por lo tanto, de los experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* se desprende que TORID, probablemente al influir en la movilización de iones, inhibe la activación del inflamasoma NLRP3, afectando de esta manera respuestas inmunes.

Los productos de la activación del inflamasoma tienen efectos sobre células de la inmunidad adaptativa. La IL-1 β favorece la diferenciación de las células Th17, así como la reprogramación de las células Treg a células T secretoras de IL-17. Por otro lado, la IL-18 amplifica la producción de IFN- γ por las células Th1. Por lo tanto, la IL-1 β e IL-18, generadas

por la activación del inflamasoma, son potentes amplificadores de respuestas inmunes adaptativas (Dostert et al. 2013). Dada la importancia de los productos de activación del inflamasoma sobre el moldeado de la respuesta inmune adaptativa, evaluamos la activación del inflamasoma en el modelo de cáncer en ratones TOR1D KO y WT. No encontramos una diferencia significativa en la cantidad de células conteniendo caspasa-1 activa (células FLICA⁺) en el tumor, tanto evaluado por citometría de flujo como por inmunofluorescencia. Sin embargo, resultados de nuestro laboratorio muestran un aumento significativo en las células conteniendo caspasa-1 activa en el ganglio que drena el tumor, tanto por citometría de flujo como por inmunofluorescencia. Por lo tanto, en nuestro modelo de desarrollo tumoral, los ratones TOR1D KO muestran una mayor activación del inflamasoma a nivel del ganglio que drena el tumor.

Nuestros resultados muestran una tendencia, que debe confirmarse, a aumento en la cantidad de células T CD4⁺RORγt⁺ en el infiltrado tumoral. El rol de las células Th17 en el cáncer es controvertido. Han sido reportados estudios que muestran un efecto anti-tumoral de las células Th17, así como otros que muestran su participación en la progresión tumoral. De hecho, una alta frecuencia en células Th17 en el infiltrado tumoral de pacientes con cáncer de colon, de hígado, o de páncreas se correlaciona fuertemente con un mal pronóstico. Sin embargo, un aumento en el número de células Th17 en tumores de ovario se ha asociado a mejor supervivencia (Bailey et al. 2014; Martin et al. 2012).

Las células Th17 se diferencian a partir de células T CD4⁺ naive en presencia de TGF-β, IL-6 e IL-1β (siendo la IL-1β un factor clave para la diferenciación de Th17 en humanos), y son mantenidas a largo plazo por la presencia de IL-21 e IL-23. Las células Th17 se caracterizan por su capacidad de secretar IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 y CCL20. La generación de las células Th17 es controlada por los factores de transcripción RORγt, RORα (receptor huérfano asociado a ácido retinoico), AHR (receptor de hidrocarburo de arilo) e IRF4 (factor regulador de interferón

4). Además las células Th17 pueden originarse a partir de células Treg en presencia de IL-1 β , así como también pueden convertirse a células Treg o Th1 bajo determinados estímulos (Martin et al. 2012). También pueden surgir fenotipos intermedios que expresan tanto FoxP3 como ROR γ t, y presentan funciones inmunosupresoras.

Las células Th17 pueden tener propiedades reguladoras o inflamatorias dependiendo de los estímulos que encuentran. Estos fenotipos contrarios pueden explicar por qué las células Th17 tienen potentes propiedades anti-tumorales en algunos diseños experimentales, mientras que en otros promueven el crecimiento tumoral (Bailey et al. 2014). Las células Th17 y sus citoquinas asociadas median la progresión tumoral a través de la inducción de angiogénesis y la supresión de respuestas anti-tumorales. La IL-17A promueve la angiogénesis y a su vez recluta células mieloides supresoras. A su vez, la TGF- β induce la expresión de las endonucleotidasas CD39 y CD73 por las células Th17. La expresión de CD39 y CD73 lleva a la transformación de ATP o ADP a adenosina, la cual tiene potente efecto inmunosupresor. Además estas células Th17 diferenciadas en presencia de TGF- β producen IL-10, reforzando su poder inmunoregulador. En cambio, las células Th17 diferenciadas en presencia de IL-1 β , IL-6 e IL-23 no expresan CD39 y CD73. Estas células co-expresan los factores de transcripción Tbet y ROR γ t, lo que resulta en la secreción de IFN- γ e IL-17, pero no IL-10 (Bailey et al. 2014; Martin et al. 2012). Estas células Th17, tipo Th1, median la regresión tumoral observada en algunos diseños experimentales. Por otro lado, las células Th17 pueden aumentar la frecuencia y función de células T CD8⁺ en el tumor. Las células Th17 pueden promover la producción de la quimioquina CCL20 por el tejido tumoral, y de esta forma reclutar células T CD8⁺ al tumor. A su vez, las células Th17 pueden activar a las células T CD8⁺ en el microambiente tumoral por mecanismos tanto directos como indirectos. Pueden interactuar directamente con células T CD8⁺ al adquirir moléculas de MHC-I-péptidos, siendo cruciales para la respuesta por las células T CD8⁺. Además al secretar IL-2 ayudan a la activación de las células T CD8⁺ (Ankathatti Munegowda et al. 2011).

Nuestros resultados sugieren que en los ratones TORID KO hay una mayor activación del inflammasoma NLRP3 a nivel del ganglio que drena el tumor; el aumento en la IL-1 β llevaría a la re-programación de las células T reguladoras a células Th17. A su vez, las células Th17 diferenciadas en presencia de IL-1 β promoverían la inmunidad anti-tumoral al inducir el reclutamiento de células T citotóxicas al tumor, además de favorecer su activación. Esto explicaría el aumento en las células T CD8⁺ encontradas en el infiltrado tumoral (Figura 24).

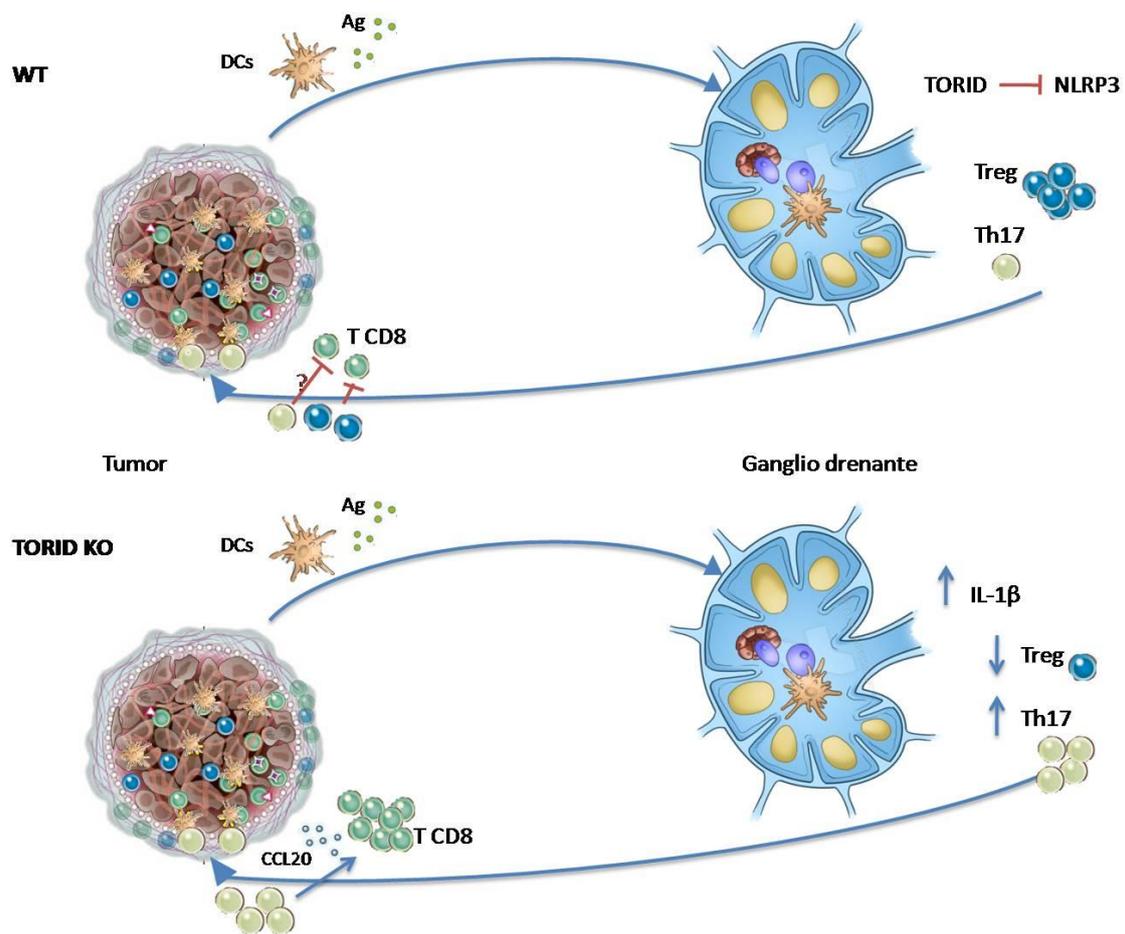


Figura 24. Esquema de los resultados obtenidos en el modelo tumoral en ratones WT y TORID KO. En los ratones WT desde el tumor migran al ganglio drenante células dendríticas (DCs) maduras, cargadas con antígenos tumorales, así como antígenos tumorales solubles. TORID, al modular la movilización de iones inhibe la activación del inflammasoma NLRP3. En el ganglio que drena el tumor se produce un gran número de células T reguladoras que migran al tumor e inhiben respuestas anti-tumorales. Las células Th17 diferenciadas en estas condiciones (baja concentración de IL-1 β) probablemente también tengan funciones inmunosupresoras, favoreciendo la progresión tumoral. En los ratones TORID KO al igual que en los WT, DCs y antígenos solubles migran al ganglio drenante. Allí se da una mayor activación del inflammasoma NLRP3, lo que resulta en un aumento en la IL-1 β . Este aumento en la citoquina IL-1 β resultaría en la re-programación de las células Treg, observándose una disminución en la cantidad de estas células y un aumento en la cantidad de células Th17. Las células Th17 diferenciadas en presencia

de IL-1 β migran al tumor y allí secretan e inducen la producción de CCL20, reclutando células T CD8 al microambiente tumoral. Estas células Th17 a su vez ayudarían a las células T citotóxicas a ejercer su función, lo que resulta en una menor progresión tumoral.

Otro de los objetivos de este trabajo de tesis de maestría fue estudiar electrofisiológicamente TORID y HCA112, proteína similar a TORID y con la cual es capaz de interactuar. Elegimos como sistema de expresión de estas proteínas las células CHO. Las células CHO son particularmente útiles para el estudio de canales iónicos exógenos por electrofisiología ya que casi no contienen canales iónicos endógenos, y no están acopladas vía “gap junctions”, por lo tanto son fáciles de estudiar en modo fijación de voltaje (Gamper et al. 2005). Los resultados obtenidos en estudios de “whole cell patch clamp” de células CHO transfectadas con TORID y HCA112 confirman resultados previos realizados en ovocitos de *Xenopus* transfectados con TORID (Segovia et al. 2014). La acidificación del medio extracelular (pH 5) generó una corriente entrante en un potencial de mantenimiento de -70 mV. El potencial de reversión de esta corriente fue cercano a -20 mV, lo que sugiere que estas proteínas se comportan como un canal catiónico no selectivo sensible al ácido. La cinética de la corriente registrada utilizando a las células CHO como sistema de expresión difiere de la registrada en *Xenopus*, en donde la corriente es más lenta y parece no desensibilizarse. Estas diferencias pueden deberse a la estrategia de expresión utilizadas. En este trabajo, TORID se encuentra acoplada a GFP, mientras que HCA112 a mCherry. La unión de estos fluoróforos a las proteínas nos permitió identificar a las células transfectadas. Sin embargo, podrían estar cambiando las características nativas del canal. Por lo que sería conveniente otra estrategia de expresión para asegurar que el canal presente su conformación y características nativas.

El cuarto objetivo de esta tesis fue el estudio de la participación de canales iónicos en la activación del inflamasoma NLRP3. La movilización de iones parece ser determinante en la activación del inflamasoma NLRP3. De los resultados obtenidos con TORID se desprende que la modulación de la activación del inflamasoma puede constituir una nueva terapia anti-tumoral.

Por lo tanto, buscamos identificar canales iónicos con la capacidad de modular al NLRP3. Para eso realizamos un “screening” de inhibidores y activadores de canales iónicos en la estimulación del NLRP3 en BMDCs. Encontramos que un grupo de fármacos que tiene como blanco a los canales de calcio de tipo L eran capaces de modular la activación del NLRP3. Los inhibidores de estos canales (verapamil, nifedipina y diltiazem) inhibieron la activación del NLRP3, mientras que el activador (BAY K-8644) fue capaz de activar al NLRP3. Estos resultados pueden aportar al debate sobre el rol del K^+ y el Ca^{2+} en la activación del inflamasoma. Mientras algunos autores plantean que es el eflujo de K^+ y no el influjo de Ca^{2+} esencial para la activación del NLRP3 (Munoz-Planillo et al. 2013; Katsnelson et al. 2015), otros plantean un rol clave del Ca^{2+} en dicha activación (Yaron et al. 2015; Triantafilou et al. 2013).

Los canales de tipo L son complejos proteicos insertos en la membrana plasmática que median el influjo de Ca^{2+} a la célula en respuesta a la depolarización de la membrana. Son canales voltaje dependientes y son sensibles a dihidropiridinas, fenilalquilaminas y benzotiazepinas. Hay 4 tipos de canales de tipo L todos compuestos por la subunidad α_1 , α_2 , β y δ , y algunos tienen además la subunidad γ . La subunidad α_1 forma el poro del canal, y además contiene una región conservada con carga positiva que censa el voltaje. La despolarización hace que esa región se mueva y de esta forma que se abra el canal (Hofmann et al. 2014). Los canales de calcio de tipo L se han considerado característicos de células excitables. Sin embargo, a pesar de que no se conoce que las células inmunes sufran despolarizaciones de membrana importantes, algunos subtipos de canales de tipo L son expresados por células inmunes (Davenport et al. 2015; Suzuki et al. 2010). El estudio de la presencia de canales de tipo L en células inmunes se realizó principalmente en linfocitos, no obstante varios estudios muestran la presencia de estos canales en el linaje mieloide (Davenport et al. 2015). Las células dendríticas expresan $Ca_v1.2$ acoplado a RyR1. La entrada de Ca^{2+} por $Ca_v1.2$ induce la liberación de más Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático a través de RyR1 (Shumilina et al. 2011). Estos canales jugarían un papel importante en la maduración de

las células dendríticas, ya que activación de vías de señalización de RyR1 genera una rápida expresión de moléculas de MHC-II en la superficie de células dendríticas inmaduras (Shumilina et al. 2011).

Los inhibidores de los canales de calcio de tipo L (nifedipina, verapamil y diltiazem) son comúnmente utilizados para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, como hipertensión arterial. Por otro lado, ha sido reportado que el diltiazem tiene efectos anti-inflamatorios. Un estudio reciente en murinos muestra el efecto beneficioso del diltiazem en prevenir la formación de aneurisma a través de la inhibición de la producción de citoquinas inflamatorias por monocitos (Mieth et al. 2013). Por lo que, entender el rol de estos canales en la inmunidad y en la inflamación es relevante terapéuticamente. En el contexto de nuestros resultados, la activación de los canales de tipo L mediante BAY K-8644 podría tener efectos anti-tumorales al activar al inflamasoma NLRP3 y de esta forma aumentar la producción de IL-1 β . Sería interesante evaluar *in vivo* si este fármaco es capaz de tener efectos anti-tumorales, pudiendo constituir un nuevo fármaco para la inmunoterapia anti-tumoral.

Una limitación importante de esta estrategia, que debe ser tomada en cuenta, es que las células tumorales también pueden expresar estos canales. De hecho, se ha reportado una sobre-expresión de canales de calcio de tipo L en cáncer de colon, próstata, mama y colorectal (Marques et al. 2015). Un estudio muestra que verapamil y diltiazem inhiben la proliferación de las células de cáncer de mama humanas HT-39, y el crecimiento tumoral *in vivo* (Taylor & Simpson 1992). Por lo tanto, el balance entre el efecto de activadores de canales de calcio de tipo L sobre células de la inmunidad y sobre células tumorales debe ser evaluado exhaustivamente.

Conclusiones y Perspectivas

Los resultados obtenidos sugieren que TORID, al ser un canal iónico, es capaz de modular la activación del inflammasoma NLRP3. La menor producción de IL-1 β regulada por TORID afecta la re-programación de las células T reguladoras y la diferenciación de las células Th17. La diferenciación de las células Th17 en estas condiciones generaría un fenotipo más inmunoregulador. Esto puede explicar las diferencias encontradas en el crecimiento tumoral y en la supervivencia de los ratones deficientes en TORID y los WT con cáncer.

Por otro lado, los canales de calcio de tipo L, al modular la activación del inflammasoma NLRP3, pueden constituir un nuevo blanco molecular para la modulación de las respuestas inmunes anti-tumorales.

Estos resultados abren como perspectiva la inhibición de TORID como nueva inmunoterapia anti-tumoral. Planeamos identificar inhibidores farmacológicos de TORID estudiando la capacidad de un panel de inhibidores de canales iónicos en inhibir la corriente generada por el ácido. Como indicador de la ocurrencia de la corriente generada por TORID se utilizará la sonda Sodium Green, que es capaz de sensar la concentración de Na⁺ intracelular. Los inhibidores identificados deberían ser capaces de inhibir la corriente entrante registrada por “whole cell patch clamp”. Otra estrategia de inhibición de TORID es la producción de una afitina que reconozca una región extracelular de TORID, induciendo cambios conformacionales que inhiban su función. Un ejemplo similar es el anticuerpo monoclonal Rituximab, que reconoce una región extracelular de CD20 (perteneciente a la misma familia de proteínas que TORID) induciendo un flujo de calcio a través de CD20 (Walshe et al. 2008). Una vez identificados o generados inhibidores de TORID, se probarán los mismos *in vivo* en el modelo de cáncer. Esperamos que ratones con cáncer tratados con el inhibidor presenten un menor crecimiento tumoral y una mayor supervivencia que los ratones con cáncer no tratados.

Referencias

- Abdel Mohsen, M.A. et al., 2000. Human bladder cancer, schistosomiasis, N-nitroso compounds and their precursors. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 88(4), pp.682–683.
- Adler, E.P. et al., 2003. A dual role for tumor-derived chemokine RANTES (CCL5). *Immunology Letters*, 90(2–3), pp.187–194.
- Anandasabapathy, N. et al., 2014. Classical Flt3L-dependent dendritic cells control immunity to protein vaccine. *The Journal of experimental medicine*, 211(9), pp.1875–1891.
- Ankathatti Munegowda, M. et al., 2011. Th17 and Th17-stimulated CD8(+) T cells play a distinct role in Th17-induced preventive and therapeutic antitumor immunity. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 60(10), pp.1473–1484.
- Aymeric, L. et al., 2010. Tumor Cell Death and ATP Release Prime Dendritic Cells and Efficient Anticancer Immunity. *Cancer Research*, 70(3), pp.855–858.
- Bailey, S.R. et al., 2014. Th17 cells in cancer: The ultimate identity crisis. *Frontiers in Immunology*, 5(JUN), pp.1–13.
- Bhatia, A. & Kumar, Y., 2011. Cancer-immune equilibrium: questions unanswered. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society*, 4(2), pp.209–217.
- Bhome, R. et al., 2015. A top-down view of the tumor microenvironment: structure, cells and signaling. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3(May), pp.1–9.
- Bunnag, S. et al., 2008. FOXP3 expression in human kidney transplant biopsies is associated with rejection and time post transplant but not with favorable outcomes. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 8(7), pp.1423–1433.
- Burnet, F.M., 1970. The concept of immunological surveillance. *Progress in experimental tumor research*, 13, pp.1–27.
- Campbell, D.J., 2015. Control of Regulatory T Cell Migration, Function, and Homeostasis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 195(6), pp.2507–2513.
- Chauhan, S.K. et al., 2009. Levels of Foxp3 in regulatory T cells reflect their functional status in transplantation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(1), pp.148–153.
- Chen, D. et al., 2013. Genome-wide association study of susceptibility loci for cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(9), pp.624–633.
- Chen, F. et al., 2015. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Medicine*, 13(1), p.45.
- Chow, M.T., Moller, A. & Smyth, M.J., 2012. Inflammation and immune surveillance in cancer. *Seminars in cancer biology*, 22(1), pp.23–32.

- Condamine, T. et al., 2010. Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells. *Journal of leukocyte biology*, 88(3), pp.507–515.
- Corthay, A., 2014. Does the immune system naturally protect against cancer? *Frontiers in Immunology*, 5(MAY), pp.1–8.
- Cuajungco, M.P. et al., 2012. Abnormal accumulation of human transmembrane (TMEM)-176A and 176B proteins is associated with cancer pathology. *Acta Histochemica*, 114(7), pp.705–712.
- Davenport, B. et al., 2015. Signature Channels of Excitability no More: L-Type Channels in Immune Cells. *Frontiers in Immunology*, 6(July), pp.1–13.
- Demaria, S. & Formenti, S.C., 2012. Radiation as an immunological adjuvant: current evidence on dose and fractionation. *Frontiers in Oncology*, 2(October), pp.1–7.
- Dostert, C., Ludigs, K. & Guarda, G., 2013. Innate and adaptive effects of inflammasomes on T cell responses. *Current Opinion in Immunology*, 25(3), pp.359–365.
- Dunn, G.P. et al., 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology*, 3(11), pp.991–998.
- Dunn, G.P., Koebel, C.M. & Schreiber, R.D., 2006. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature reviews. Immunology*, 6(11), pp.836–848.
- Ehrlich, P., 1909. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. , pp.5:273–290.
- Eon Kuek, L. et al., 2015. The MS4A family: counting past 1, 2 and 3. *Immunology and Cell Biology*, (April), pp.1–13.
- Ercolini, A.M. et al., 2005. Recruitment of latent pools of high-avidity CD8(+) T cells to the antitumor immune response. *The Journal of experimental medicine*, 201(10), pp.1591–1602.
- Feigenspan, a & Bormann, J., 1994. Modulation of GABA_C receptors in rat retinal bipolar cells by protein kinase C. *J.Physiol.(Lond.)*, 481, pp.325–330.
- Ferrara, N. et al., 2004. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature reviews. Drug discovery*, 3(5), pp.391–400.
- Galluzzi, L. et al., 2014. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*, 5(24).
- Gamper, N., Stockand, J.D. & Shapiro, M.S., 2005. The use of Chinese hamster ovary (CHO) cells in the study of ion channels. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 51(3 SPEC. ISS.), pp.177–185.
- Gao, Y. et al., 2013. Control of T Helper 2 Responses by Transcription Factor IRF4-Dependent Dendritic Cells. *Immunity*, 39(4), pp.722–732.

- Gebremeskel, S. & Johnston, B., 2015. Concepts and mechanisms underlying chemotherapy induced immunogenic cell death : Impact on clinical studies and considerations for combined therapies.
- Golden, E.B. et al., 2013. An Abscopal Response to Radiation and Ipilimumab in a Patient with Metastatic Non–Small Cell Lung Cancer. *Cancer Immunology Research* , 1 (6), pp.365–372.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R. & Karin, M., 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), pp.883–899.
- Gunthorpe, M. et al., 2001. Characterisation of a human acid-sensing ion channel (hASIC1a) endogenously expressed in HEK293 cells. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 442(5), pp.668–674.
- Guo, H., Callaway, J.B. & Ting, J.P.-Y., 2015. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature medicine*, 21(7), pp.677–687.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–674.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), pp.57–70.
- Herrera, L.A. et al., 2005. Role of infectious diseases in human carcinogenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*, 45(2-3), pp.284–303.
- Hoffman, E.S., Smith, R.E.T. & Renaud, R.C.J., 2005. From the analyst’s couch: TLR-targeted therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery*, 4(11), pp.879–880.
- Hofmann, F. et al., 2014. L-type CaV1.2 calcium channels: from in vitro findings to in vivo function. *Physiological reviews*, 94, pp.303–26.
- Hornung, V. et al., 2008. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature immunology*, 9(8), pp.847–856.
- Imai, K. et al., 2000. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *The Lancet*, 356(9244), pp.1795–1799.
- Izhak, L. et al., 2013. Delicate balance among three types of T cells in concurrent regulation of tumor immunity. *Cancer research*, 73(5), pp.1514–1523.
- Kaminski, J.M. et al., 2005. The controversial abscopal effect. *Cancer Treatment Reviews*, 31(3), pp.159–172.
- Kareva, I. & Berezovskaya, F., 2015. Cancer immunoediting: A process driven by metabolic competition as a predator–prey–shared resource type model. *Journal of Theoretical Biology*, 380, pp.463–472.

- Katsnelson, M.A. et al., 2015. K⁺ efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca²⁺ signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 194(8), pp.3937–3952.
- Koebel, C.M. et al., 2007. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*, 450(7171), pp.903–907.
- Liu, X. et al., 2015. C/EBPβ promotes angiogenesis through secretion of IL-6, which is inhibited by genistein, in EGFRvIII-positive glioblastoma. *Int J Cancer*, 136(11), pp.2524–2534.
- Louvet, C. et al., 2005. Identification of a new member of the CD20/FcεRIβ family overexpressed in tolerated allografts. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 5(9), pp.2143–53.
- Lu, J. et al., 2015. CC motif chemokine ligand 19 suppressed colorectal cancer in vivo accompanied by an increase in IL-12 and IFN-γ. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 69, pp.374–379.
- Lu, J. et al., 2015. Phenotype and function of tissue-resident unconventional Foxp3-expressing CD4⁺ regulatory T cells. *Cellular Immunology*, 297(1), pp.53–59.
- Marigo, I. et al., 2010. Tumor-Induced Tolerance and Immune Suppression Depend on the C/EBPβ Transcription Factor. *Immunity*, 32(6), pp.790–802.
- Marques, R. et al., 2015. 5α-Dihydrotestosterone regulates the expression of L-type calcium channels and calcium-binding protein regucalcin in human breast cancer cells with suppression of cell growth. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 32(9), p.228.
- Marrero, I., Ware, R. & Kumar, V., 2015. Type II NKT Cells in Inflammation, Autoimmunity, Microbial Immunity, and Cancer. *Frontiers in Immunology*, 6, p.316.
- Martin, D. & Gutkind, J.S., 2008. Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene*, 27 Suppl 2, pp.S31–42.
- Martin, F., Apetoh, L. & Ghiringhelli, F., 2012. Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF-β-dependent immunosuppressive activity? *Trends in molecular medicine*, 18(12), pp.742–749.
- McEwen-Smith, R.M., Salio, M. & Cerundolo, V., 2015. The regulatory role of invariant NKT cells in tumor immunity. *Cancer immunology research*, 3(5), pp.425–435.
- McLaughlin-Drubin, M.E. & Munger, K., 2008. Viruses associated with human cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1782(3), pp.127–150.
- Mellor, A.L. & Munn, D.H., 2011. Physiologic control of the functional status of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(8), pp.4535–4540.

- Melum, E. et al., 2008. Cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis is associated with NKG2D polymorphisms. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 47(1), pp.90–96.
- Mieth, A. et al., 2013. L-type calcium channel inhibitor diltiazem prevents aneurysm formation by blood pressure-independent anti-inflammatory effects. *Hypertension*, 62(6), pp.1098–1104.
- Ming Lim, C. et al., 2013. TLR3 agonists improve the immunostimulatory potential of cetuximab against EGFR head and neck cancer cells. *Oncoimmunology*, 2(6), p.e24677.
- Mittal, D. et al., 2014. New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, 27(1), pp.16–25.
- Munoz-Planillo, R. et al., 2013. K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*, 38(6), pp.1142–1153.
- Murakami, T. et al., 2012. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(28), pp.11282–11287.
- Murphy, K., Travers, P. & Walport, M., 2008. *Janeway's Immunobiology*,
- Nishikawa, H. & Sakaguchi, S., 2014. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology*, 27(1), pp.1–7.
- Nishikawa, H. & Sakaguchi, S., 2010. Regulatory T cells in tumor immunity. *International Journal of Cancer*, 127(4), pp.759–767.
- OLD, L.J. & BOYSE, E.A., 1964. IMMUNOLOGY OF EXPERIMENTAL TUMORS. *Annual review of medicine*, 15, pp.167–186.
- Onizuka, S. et al., 1999. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer research*, 59(13), pp.3128–3133.
- Otsubo, T. et al., 2014. Identification of novel targets for antiangiogenic therapy by comparing the gene expressions of tumor and normal endothelial cells. *Cancer Science*, 105, pp.560–567.
- Palucka, K. & Banchereau, J., 2012. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature reviews. Cancer*, 12(4), pp.265–277.
- Peto, J., 2001. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature*, 411(6835), pp.390–395.
- Pietras, K. et al., 2008. Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS medicine*, 5(1), p.e19.
- Pisani, P. et al., 1997. Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American*

Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 6(6), pp.387–400.

Postow, M.A. et al., 2012. Immunologic Correlates of the Abscopal Effect in a Patient with Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 366(10), pp.925–931.

Quezada, S.A. et al., 2011. Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication. *Immunological reviews*, 241(1), pp.104–118.

Reynders, K. et al., 2015. The abscopal effect of local radiotherapy: using immunotherapy to make a rare event clinically relevant. *Cancer Treatment Reviews*.

Sakaguchi, S. et al., 2008. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell*, 133(5), pp.775–787.

Scott, S.D., 1998. Rituximab: a new therapeutic monoclonal antibody for non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer practice*, 6(3), pp.195–197.

Segovia, M. et al., 2014. Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation. *American Journal of Transplantation*, 14(5), pp.1021–1031.

Sharma, P. & Allison, J.P., 2015. The future of immune checkpoint therapy. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6230), pp.56–61.

Shumilina, E., Huber, S.M. & Lang, F., 2011. Ca²⁺ signaling in the regulation of dendritic cell functions. *Am J Physiol Cell Physiol*, 300(84), pp.1205–1214.

Stamell, E.F. et al., 2015. The Abscopal Effect Associated With a Systemic Anti-melanoma Immune Response. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics*, 85(2), pp.293–295.

Suzuki, Y., Inoue, T. & Ra, C., 2010. L-type Ca²⁺ channels: A new player in the regulation of Ca²⁺ signaling, cell activation and cell survival in immune cells. *Molecular Immunology*, 47(4), pp.640–648.

Tan, M.C.B. et al., 2009. Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(3), pp.1746–1755.

Taylor, J.M. & Simpson, R.U., 1992. Inhibition of cancer cell growth by calcium channel antagonists in the athymic mouse. *Cancer research*, 52(9), pp.2413–2418.

Tesniere, A. et al., 2008. Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Current Opinion in Immunology*, 20(5), pp.504–511.

Triantafilou, K. et al., 2013. The complement membrane attack complex triggers intracellular Ca²⁺ fluxes leading to NLRP3 inflammasome activation. *Journal of cell science*, 126(Pt 13), pp.2903–13.

Vanaja, S.K., Rathinam, V. a. K. & Fitzgerald, K. a., 2015. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends in Cell Biology*, pp.1–8.

- Vignali, D.A.A., Collison, L.W. & Workman, C.J., 2008. How regulatory T cells work. *Nature reviews. Immunology*, 8(7), pp.523–532.
- Walshe, C.A. et al., 2008. Induction of Cytosolic Calcium Flux by CD20 Is Dependent upon B Cell Antigen Receptor Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 283 (25), pp.16971–16984.
- Wang, Y. et al., 2002. Large Scale Identification of Human Hepatocellular Carcinoma-Associated Antigens by Autoantibodies. *The Journal of Immunology*, 169(2), pp.1102–1109.
- Yaron, J.R. et al., 2015. K(+) regulates Ca(2+) to drive inflammasome signaling: dynamic visualization of ion flux in live cells. *Cell death & disease*, 6, p.e1954.
- Yu, P. et al., 2005. Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *The Journal of experimental medicine*, 201(5), pp.779–791.
- Zitvogel, L. et al., 2012. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nature immunology*, 13(4), pp.343–51.
- Zuccolo, J. et al., 2010. Phylogenetic analysis of the MS4A and TMEM176 gene families. *PLoS ONE*, 5(2), pp.1–10.