



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy

Estudio de la potencial interacción entre dos puntos de control inmunológico

Valentina Pérez

Orientadora: Msc. Sofía Russo

Co- orientador: Dr. Marcelo Hill

Tesina de Finalización de Carrera

Licenciatura en Ciencias Biológicas, Opción Biología Celular

Facultad de Ciencias, UdelAR

Laboratorio de Inmunoregulación e Inflamación

Institut Pasteur de Montevideo - Departamento de
Inmunobiología, Facultad de Medicina, UdelAR

Enero 2019



Institut Pasteur
de Montevideo

Agradecimientos

-A Marcelo por dejarme formar parte de su grupo de investigación y siempre confiar en mí.

-A Sofía, por enseñarme todo, siempre tomarse el tiempo de explicarme las cosas hasta que las entiendo, estar dispuesta a contestar mis 1500 preguntas por día y ser una excelente compañera todos los días.

-A todos los integrantes del LIRI, los que están y los que ya no, Mercedes, Sabina, Alejandro, Daniela, Germán, Javier, Mathias, Maite y Florencia; todos contribuyeron a que pudiera hacer este trabajo (incluso bajándome cosas de los estantes altos) y hacen que trabajar en el laboratorio de gusto.

-Al tribunal, Álvaro y Sergio, por aceptar formar parte de él, corregirme la tesis a tiempo, aun cuando la mandé tan sobre la fecha, y darme tan buenos consejos.

-A mis amigos de siempre, Fernando, Martín, Felipe, Adrián, Vladimir, y Camila, que siempre me apoyaron incondicionalmente, y estuvieron ahí para escuchar mis explicaciones y darme para adelante cuando lo necesité.

-A mis amigos de facultad, Constanza, Diego, Gabriel y Nacho, por acompañarme en los últimos años y hacer a la carrera un poco más entretenida.

-A Matías, que siempre está ahí para apoyarme y aguantar mi estrés y mis días de mal humor.

-A toda mi familia, por apoyarme de forma incondicional para hacer lo que yo quiero, nunca rendirme y dar lo mejor de mí.

-A mis padres, que siempre me dan para adelante y me aguantan, incluso en mis peores momentos, y a mi padre porque sin saberlo me inculcó desde muy chiquita mi pasión por la biología y por siempre querer saber más.

-A mi hermana, porque siempre está apoyándome y bancándome a pesar de las peleas, porque se sienta a escucharme aunque sé que no le gusta la biología, y porque siempre se alegra por mí.

Índice

Resumen.....	4
Introducción.....	6
Cáncer.....	6
Biología del cáncer.....	7
Microambiente tumoral.....	12
El sistema inmune en el cáncer.....	14
Inflamasoma y cáncer.....	19
Puntos de control inmunológico y su rol en las terapias anti-tumorales.....	25
Tmem176b.....	28
Indoleamina 2,3-dioxigenasa.....	29
Objetivos.....	33
Metodología.....	34
Generación y caracterización de BMDCs.....	34
Estudio de la producción de IL-1 β en BMDCs mediante ELISA.....	35
Estudio de la expresión de IDO1 en BMDCs mediante Western Blot.....	37
Desarrollo tumoral en ratones.....	39
Estudio de la expresión de IDO1 en tumores y ganglios drenantes del tumor.....	40
Western Blot.....	40

RT-PCR cuantitativa.....	41
Análisis de la producción de quinurenina en tumores.....	42
Resultados y Discusión.....	44
Estudio de la expresión de IL-1 β e IDO1 en BMDCs <i>Tmem176b</i> ^{-/-} y WT.....	44
Caracterización de BMDCs.....	44
Producción de IL-1 β por BMDCs <i>Tmem176b</i> ^{-/-} y WT.....	48
Expresión de IDO1 en BMDCs <i>Tmem176b</i> ^{-/-} y WT.....	50
Estudio de la expresión y actividad de IDO1 en tumor y ganglio drenante de tumor de ratones <i>Tmem176b</i> ^{-/-} y WT.....	56
Expresión de IDO1 en tumor y ganglio drenante de tumor de ratones <i>Tmem176b</i> ^{-/-} y WT.....	56
Producción de quinurenina a nivel tumoral en ratones <i>Tmem176b</i> ^{-/-} y WT.....	62
Conclusiones y Perspectivas.....	68
Bibliografía.....	71

Resumen

El cáncer corresponde a un grupo de enfermedades caracterizadas por la proliferación y el comportamiento celular alterados, que son causadas por cambios irreversibles que llevan a las células a adquirir un fenotipo maligno. Esta enfermedad es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en el mundo.

Las células tumorales pueden ser eliminadas a través de diferentes mecanismos del sistema inmunológico. Sin embargo, las mismas pueden escapar de la acción anti-tumoral del sistema inmune, desencadenando mecanismos inmunoreguladores en el microambiente tumoral. Dentro de estos mecanismos se encuentran los puntos de control inmunológico, moléculas capaces de regular la respuesta inmunológica.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la interacción entre dos puntos de control inmunológico, la proteína Tmem176b y la enzima indoleamina 2-3 dioxigenasa (IDO1). Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que la deficiencia en Tmem176b conduce a una desinhibición del inflamasoma NLRP3 y la consecuente producción aumentada de IL-1 β . Por otra parte, existe evidencia de que la IL-1 β es capaz promover el aumento de la expresión de IDO1 en células tumorales. En base a esto, planteamos la hipótesis de que Tmem176b, al regular la activación del inflamasoma, podría estar regulando a su vez la expresión de IDO1.

Evidenciamos que a nivel tumoral la deficiencia en *Tmem176b* da lugar a una producción y actividad enzimática aumentada de IDO1. Sin embargo, esto parecería no ser mediado directamente por el aumento de IL-1 β , ya que en el ganglio linfático que drena el tumor, donde hemos demostrado el aumento de esta citoquina en ratones *Tmem176b*^{-/-}, no observamos una diferencia significativa en la expresión de IDO1 entre estos animales y los salvajes (WT, del inglés, *Wild Type*).

En conclusión, los resultados de este trabajo plantean la posible existencia de un mecanismo contra-regulador a nivel tumoral, donde la sobre-activación del sistema inmune por la desinhibición del inflamasoma NLRP3 generaría una expresión aumentada de IDO1. Esto da la posibilidad de desarrollar estrategias para favorecer las respuestas anti-tumorales combinando la desinhibición del inflamasoma, que hemos demostrado que es capaz de favorecer la respuesta anti-tumoral, con la inhibición de IDO1.

Introducción

Cáncer

El cáncer corresponde a un grupo de enfermedades caracterizadas por la proliferación y el comportamiento celular alterados, que son causadas por cambios irreversibles que llevan a las células a adquirir un fenotipo maligno. Estos cambios incluyen la proliferación descontrolada y el “comportamiento asocial”, y ocasionan que las células tumorales se multipliquen sin seguir criterios morfológicos ni funcionales, invadiendo tejidos adyacentes o distantes. Este proceso patológico eventualmente provoca un fallo de las funciones vitales que es incompatible con la vida del huésped (Hill, 2006).

La alteración del comportamiento en las células tumorales tiene un origen molecular. Diferentes evidencias sugieren que el cáncer es la consecuencia de una desregulación génica, que se da por la acumulación de alteraciones no letales (Vogelstein y Kinzler, 1993). La masa tumoral es originada por la expansión de una célula monoclonal que sufrió daño en su material genético como consecuencia de la acción de diferentes agentes (biológicos, químicos o físicos), lo cual lleva a una alteración del programa genético celular, favoreciendo el crecimiento descontrolado (Bertram, 2000). Se ha demostrado que durante la evolución del cáncer, los tumores se vuelven más agresivos y aumentan su capacidad maligna; este fenómeno es denominado progresión tumoral. Se propone que la progresión tumoral puede ser explicada en parte por el surgimiento de diferentes sub-poblaciones celulares en el tumor, que difieren a

nivel fenotípico. De esta manera, a pesar de que los tumores son monoclonales en su origen, las poblaciones celulares que los componen son altamente heterogéneas cuando el cáncer es clínicamente evidente (Cahill et al., 1999). Esta heterogeneidad se genera porque las células tumorales son genéticamente inestables (Hill, 1990), lo cual las hace susceptibles a una alta tasa de mutaciones aleatorias durante la expansión clonal, que facilita la progresión hacia un fenotipo maligno. Así, el desarrollo tumoral sucede de una forma similar a la evolución darwiniana, en el sentido de que una serie de alteraciones genéticas adquiridas lleva a la conversión progresiva de las células normales hacia un fenotipo tumoral, que les permite a las mismas escapar de la presión selectiva.

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en el mundo, con aproximadamente 14 millones de casos anuales y 8 millones de muertes asociadas a esta enfermedad (Stewart y Wild, 2014). Uruguay presenta una importante incidencia de cáncer, parcialmente asociada a la gran cantidad de casos de cáncer de pulmón y otros tipos de cáncer relacionados con el tabaquismo (Abascal et al., 2012).

Biología del cáncer

Las células tumorales, si bien son ampliamente diversas, presentan ciertas características biológicas compartidas que adquieren durante diferentes etapas del desarrollo tumoral, y que permiten la proliferación celular inadecuada y el crecimiento de poblaciones de células tumorales neoplásicas. Estas características fueron conceptualizadas por Hanahan y Weinberg, en lo que los

autores denominaron los “distintivos del cáncer” (Hanahan y Weinberg, 2000, 2011, 2016) (Figura 1).

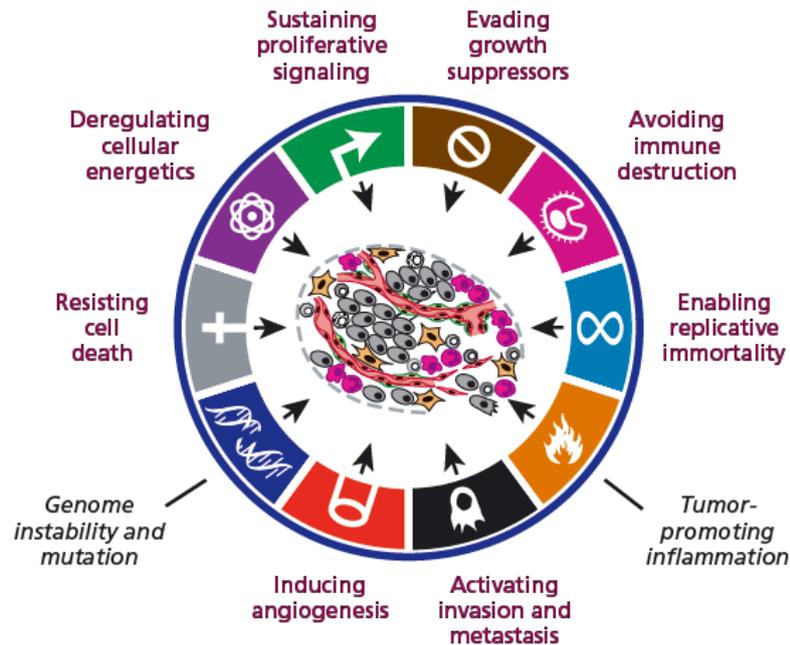


Figura 1. Distintivos del cáncer descritos por Hanahan y Weinberg. El esquema muestra las condiciones necesarias para la progresión de la enfermedad, que se agrupan en ocho características funcionales y dos factores promotores de la adquisición de dichas características (en letra negra cursiva). Estos distintivos pueden ser adquiridos durante las diversas etapas del desarrollo de la enfermedad a través de diferentes mecanismos. *Extraído y modificado de Hanahan y Weinberg, 2011, 2016.*

Una de las características típicas del cáncer es la proliferación celular inadecuada. Esta proliferación es en parte debida a la activación y el mantenimiento crónico de señales inductoras, que favorecen la entrada y la progresión del ciclo celular de las células tumorales, lo cual constituye uno de los distintivos descritos por Hanahan y Weinberg (Hanahan y Weinberg, 2016). El mecanismo mejor conocido que ocasiona este fenómeno tiene que ver con la mutación de genes en las células tumorales, los cuales al activarse ocasionan

que la proliferación de dichas células pase a ser crónica. Estos genes se denominan oncogenes, y habitualmente codifican para proteínas que son responsables de recibir señales extracelulares de proliferación y de transmitir las al interior celular. Dentro de estos oncogenes los más conocidos en los cánceres humanos incluyen el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés, *Epidermal Growth Factor*), y los transductores de señales de la vía de la MAP quinasa (Davies y Samuels, 2010). Otro de los distintivos de las células tumorales, que contribuye a la proliferación descontrolada de las mismas, tiene que ver con la evasión de los mecanismos de supresión del crecimiento (Hanahan y Weinberg, 2016). Dichos mecanismos de supresión son llevados a cabo por proteínas codificadas por genes supresores de tumores, que ocasionan el arresto del ciclo celular. Dentro de estas proteínas se encuentran la proteína asociada a retinoblastoma (pRB) y la proteína p53, las cuales determinan si las células deben proliferar, o por el contrario activar programas de senescencia o apoptosis (Burkhardt y Sage, 2008; Deshpande et al., 2005; Sherr y McCormick, 2002). En las células tumorales, existen defectos en estas proteínas, y de hecho se ha demostrado que el gen p53 se encuentra mutado en aproximadamente 40% de los tumores humanos.

Además de la proliferación descontrolada, otro distintivo del cáncer es la capacidad de las células tumorales de resistir a la muerte celular (Hanahan y Weinberg, 2016), un mecanismo celular intrínseco que funciona como una barrera para impedir la proliferación de células aberrantes, y por tanto el desarrollo del cáncer (Adams y Cory, 2007; Evan y Littlewood, 1998; Lowe et al., 2004). El escape de las células tumorales de la muerte celular es lo que les

permite a las mismas progresar hacia etapas malignas de la enfermedad, y les otorga resistencia a las terapias (Adams y Cory, 2007; Lowe et al., 2004). Este escape parece estar mediado por varios mecanismos, entre ellos el más común es la pérdida de la proteína supresora de tumores p53, lo cual impide el funcionamiento de un sensor crítico para el circuito de inducción de la apoptosis. En adición al escape de la muerte celular, las células tumorales poseen la capacidad de inmortalidad, que les otorga un potencial replicativo ilimitado. Esta capacidad recae en la habilidad de las células malignas de escapar de la senescencia celular, esto es, la entrada en un estado viable pero no proliferativo, y de la fase de crisis posterior, caracterizada por la muerte celular (Hanahan y Weinberg, 2016).

Otra característica distintiva de las células tumorales es su capacidad para inducir la angiogénesis, ya que, al igual que los órganos normales, los tumores requieren suministro de oxígeno y nutrientes (Hanahan y Weinberg, 2016). Durante la progresión tumoral se da una activación de la angiogénesis que se mantiene, ocasionando que la vasculatura, que se encuentra quiescente en condiciones fisiológicas, genere nuevos vasos sanguíneos que colaboran a mantener el crecimiento tumoral (Hanahan y Folkman, 1996). Este proceso de inducción angiogénica está mediado por factores como el factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGF-A, del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor A*), el cual es inducido en condiciones de hipoxia y por oncogenes (Carmeliet, 2005; Ferrara, 2009; Gabhann y Popel, 2008) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, del inglés, *Fibroblast Growth Factor*), que se encuentra crónicamente sobre-expresado en los tumores (Baeriswyl y Christofori, 2009).

Otro distintivo del cáncer es la capacidad de las células tumorales de volverse invasivas y migratorias, lo cual les permite dar lugar a la metástasis, invadiendo los tejidos adyacentes, así como los vasos linfáticos y sanguíneos, a su vez posibilitando a las células tumorales a invadir sitios anatómicamente distantes (Hanahan y Weinberg, 2016). Los mecanismos que dan lugar a la invasión y la metástasis son muy complejos, e involucran varios programas celulares intrínsecos y extrínsecos a las células tumorales. Dentro de las vías intrínsecas, la más destacada es la activación de un programa del desarrollo embrionario denominado transición epitelio-mesénquima (Hanahan y Weinberg, 2011; Weinberg, 2014). Este programa se asocia típicamente a la migración celular y la invasión tisular durante la organogénesis normal, aunque al activarse en algunos tipos de tumores, como por ejemplo los carcinomas, facilita la migración invasiva (Hanahan y Weinberg, 2016).

Debido a la gran capacidad proliferativa de las células tumorales, otra de sus características distintivas tiene que ver con la desregulación del metabolismo celular (Hanahan y Weinberg, 2016). Las células tumorales, en adición a la fosforilación oxidativa, utilizan la vía de glucólisis aerobia para aumentar su consumo de glucosa (Warburg, 1956). Esto, además de la generación de ATP (adenosín trifosfato, del inglés, *Adenosine TriPhosphate*), posibilita la producción de las macromoléculas necesarias para el crecimiento y la división celular. Adicionalmente, las células tumorales son también capaces de utilizar glutamina (Daye y Wellen, 2012) y lactato (Dhup et al., 2012) como fuente de energía.

Finalmente, el último distintivo de las células tumorales descrito por Hanahan y Weinberg es la capacidad que estas poseen de escapar de la destrucción mediada por el sistema inmune (Hanahan y Weinberg, 2016). Como se explicará más adelante, el sistema inmune juega un rol fundamental como barrera a la progresión tumoral (Ehrlich, 1956), sin embargo, en muchos casos los tumores pueden escapar de esta barrera progresando hacia la enfermedad.

Estos “distintivos del cáncer” son adquiridos por las células tumorales a medida que se da el progreso hacia la enfermedad mediante dos grandes mecanismos: 1) la inestabilidad del genoma, que resulta en la mutación de genes que permiten el desarrollo de los distintivos; 2) la inflamación generada por células del sistema inmune, la cual a pesar de poseer la finalidad de erradicar la enfermedad, provee factores angiogénicos y señales proliferativas y de supervivencia, y facilita la invasión por las células tumorales (Hanahan y Weinberg, 2016).

Microambiente tumoral

Los tumores sólidos son estructuras histológicas complejas que suelen compartimentalizarse en un parénquima, formado por las células tumorales, y en un estroma, constituido por una gran variedad de células no tumorales. La conjunción de ambos compartimentos con el material extracelular es lo que se conoce como “microambiente tumoral” (TME, del inglés, *Tumor Microenvironment*) (Hanahan y Weinberg, 2011, 2016) (Figura 2).

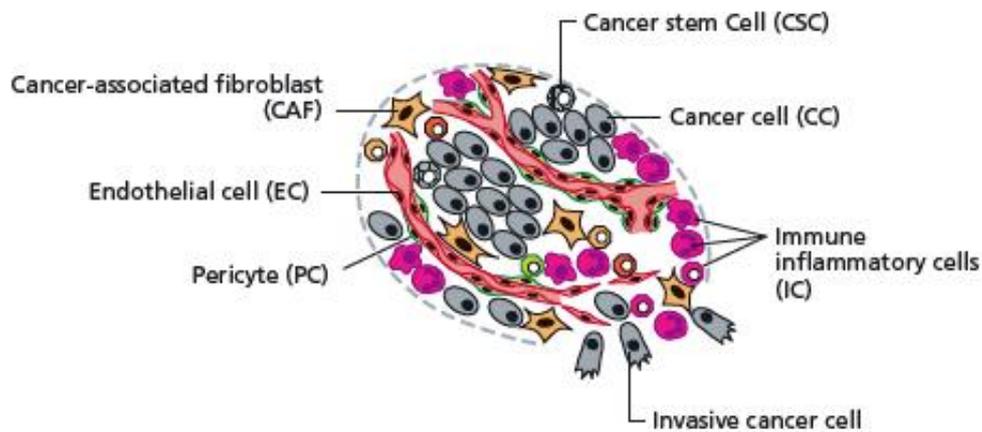


Figura 2. El microambiente tumoral (TME). El TME de la mayor parte de los tumores sólidos está constituido por diferentes tipos celulares, que pueden organizarse en dos compartimentos, el parénquima, formado por células tumorales y células madre tumorales, y el estroma de células de soporte, constituido por fibroblastos asociados a tumor, células endoteliales, pericitos y células inmunes infiltrantes del tumor. *Extraído y modificado de Hanahan y Weinberg, 2011, 2016.*

En lo que refiere al parénquima tumoral, las células tumorales allí presentes son ampliamente heterogéneas, tanto a nivel genético como funcional (Hanahan y Weinberg, 2016). Adicionalmente, se ha evidenciado que dentro de estas células existe una subclase denominada células madre tumorales (CSC, del inglés, *Cancer Stem Cells*), que presentan marcadores de células madre (Al-Hajj et al., 2003), y son capaces de generar tumores al ser inyectadas en animales (Cho y Clarke, 2008; Lobo et al., 2007).

El estroma tumoral es el sitio donde se encuentra la mayor heterogeneidad a nivel del TME. Este compartimento está compuesto por varias clases de células: las células endoteliales y los pericitos, que en conjunto favorecen la angiogénesis a nivel tumoral, los fibroblastos asociados a tumor y las células inmunes que infiltran el tumor, entre ellas células dendríticas (DCs, del inglés, *Dendritic Cells*),

macrófagos, neutrófilos, células NK (asesinas naturales, del inglés, *Natural Killers*), linfocitos B y linfocitos T (Hanahan y Weinberg, 2011, 2016).

Todas las células presentes en el TME y las diferentes moléculas producidas por las mismas son capaces de contribuir al desarrollo de los diferentes distintivos del cáncer anteriormente mencionados (Hanahan y Coussens, 2012; Hanahan y Weinberg, 2011), por lo cual se ha planteado que la biología tumoral solo puede ser entendida de forma amplia si se estudian las diversas poblaciones celulares presentes en el TME.

El sistema inmune en el cáncer

El sistema inmune posee un rol central en la eliminación de células tumorales. Este rol fue propuesto por Paul Ehrlich (Ehrlich, 1956), y posteriormente estudiado en mayor detalle por Lewis Thomas y Frank MacFarlane Burnet, quienes propusieron el concepto de inmunovigilancia, el cual plantea la idea de que el sistema inmune es capaz de detectar y eliminar a las células tumorales, previniendo el avance de la enfermedad (Burnet, 1971). En la actualidad, el concepto de inmunovigilancia ha sido ampliado hacia el de inmunoedición (Dunn et al., 2002; Dunn et al., 2004a). La inmunoedición se encuentra definida por tres etapas: eliminación, equilibrio y escape. La eliminación representa el concepto clásico de inmunovigilancia, donde el sistema inmune actúa para erradicar el tumor en desarrollo, el equilibrio refiere a un periodo de latencia, donde las células tumorales experimentan cambios y mutaciones como resultado de la

presión selectiva impuesta por el sistema inmune, que les permiten sobrevivir, de forma que el tumor no es completamente eliminado, y el escape tiene que ver con el crecimiento final de los tumores que han superado las restricciones inmunológicas de la fase de equilibrio (Dunn et al., 2004b).

Las células tumorales pueden ser eliminadas por diferentes componentes del sistema inmune, tanto innato como adaptativo (Palucka y Coussens, 2016). A pesar de esto, las células T juegan un rol central en el proceso de eliminación de las células tumorales, ya que el vasto repertorio de receptores para antígenos que estas poseen (TCR, del inglés, *T Cell Receptor*) les permiten reconocer los neoantígenos generados por las mutaciones que tienen lugar en las células malignas (Gros et al., 2014; Gubin et al., 2014; Linnemann et al., 2015; Tran et al., 2014). La gran diversidad de sus receptores les posibilita a las células T acompañar la complejidad y la enorme capacidad de mutación de las células tumorales (Sharma y Allison, 2015). Los antígenos tumorales son presentados a las células T en la superficie de las DCs, donde se encuentran asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés, *Major Histocompatibility Complex*), tanto en los ganglios linfáticos como en el tumor. Cuando las DCs presentan los antígenos tumorales a células TCD8⁺ en un contexto co-estimulador, caracterizado por la presencia de moléculas como CD80, CD86, CD70 y 4-1BB, y citoquinas como la interleuquina (IL) -12, interferones de tipo I e IL-15, los linfocitos TCD8⁺ pueden diferenciarse a linfocitos T citotóxicos (CTLs, del inglés, *Cytotoxic T Lymphocytes*) capaces de inducir la apoptosis de las células tumorales (Steinman, 2012). De esta manera, las células TCD8⁺ se consideran las principales células efectoras anti-tumorales,

ya que dan lugar a CTLs, capaces de destruir a las células tumorales (Appay et al., 2008).

Si bien el sistema inmune posee un rol anti-tumoral fundamental, particularmente a través de células como los linfocitos T y células NK, se ha demostrado que también es capaz de actuar promoviendo el desarrollo tumoral. Existen una gran cantidad de células inmunitarias en el TME, entre ellas macrófagos, neutrófilos, mastocitos, células B y células T, que juegan un rol dual en la inmunidad anti-tumoral (Coffelt et al., 2010; De Palma et al., 2007; DeNardo et al., 2010; Egeblad et al., 2010; Flier et al., 1986; Johansson et al., 2008; Murdoch et al., 2008; Schäfer y Werner, 2008), ya que son capaces de responder plásticamente a señales extrínsecas (Balkwill et al., 2005). A grandes rasgos, la capacidad del sistema inmune de promover y/o impedir el desarrollo tumoral puede ser explicada por la existencia de dos tipos de inflamación con efectos opuestos a nivel tumoral: 1) la inflamación crónica, que promueve la supervivencia de las células tumorales, la angiogénesis, la remodelación tisular y la metástasis; 2) la inflamación aguda, la cual desencadena la destrucción de las células tumorales. (Palucka y Coussens, 2016).

Durante el desarrollo tumoral se reclutan células inmunes al tejido, como macrófagos, neutrófilos, linfocitos B y linfocitos T, que pueden o no eliminar de forma eficiente a las células tumorales. Cuando la respuesta anti-tumoral del sistema inmune es eficiente, las células tumorales son detectadas y eliminadas (Dunn et al., 2004a), sin embargo, cuando el sistema inmune falla, las células tumorales son retenidas en el TME, escapando de la eliminación (Palucka y

Coussens, 2016). A medida que las células tumorales escapan de la eliminación, algunas se vuelven menos inmunogénicas utilizando diversos mecanismos, entre ellos la activación de programas intrínsecos de expresión génica que suprimen las respuestas T anti-tumorales. En este contexto se secretan citoquinas como el factor de crecimiento transformante β (TGF β , del inglés, *Transforming Growth Factor β*), las IL-4, IL-13, IL-8 e IL-10, la linfopoyetina del estroma tímico (TSLP, del inglés, *Thymic Stromal Lymphopoietin*) y enzimas como la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO1) (Coussens et al., 2013; Uyttenhove et al., 2003). La expresión de estas moléculas da lugar al reclutamiento de células B reguladoras (Bregs), T reguladoras (Treg), células TCD4⁺ con perfil TH2, y macrófagos y monocitos polarizados hacia un perfil TH2; este perfil TH2 es característico de la inflamación crónica (Palucka y Coussens, 2016). En respuesta a dicho perfil, diversas células mieloides, como macrófagos y neutrófilos, producen factores angiogénicos (VEGF), de crecimiento y/o de supervivencia (EGF, TNF α , factor de necrosis tumoral, del inglés *Tumor Necrosis Factor α*), que regulan directamente la proliferación de las células epiteliales, así como enzimas remodeladoras de la matriz extracelular (metalo-, cistein- y serin-proteasas) (Egeblad et al., 2010; Johansson et al., 2008; Mantovani, 2010; Murdoch et al., 2008; Qian y Pollard, 2010). En conjunto, estos factores propician la progresión tumoral, ya que promueven la generación de vasos sanguíneos capaces de nutrir el TME, favoreciendo así la supervivencia de las células tumorales y su proliferación mantenida (Balkwill et al., 2005). Simultáneamente, la activación de macrófagos y monocitos con un perfil TH2 ocasiona que los mismos aumenten la expresión de moléculas como la sintasa inducible de óxido

nítrico (iNOS, del inglés, *inducible Nitric Oxide Synthase*) o la arginasa 1, que suprimen la actividad de los linfocitos TCD8⁺ y amplifican el estado inflamatorio crónico, así como la secreción de citoquinas como la IL-10, la cual inhibe la maduración de las DCs (Ruffell et al., 2014). Esto imposibilita la activación de células T anti-tumorales, y ocasiona la generación de células Treg, que impiden la actividad de los CTLs y evitan la respuesta anti-tumoral (Zhu y Paul, 2008).

De esta manera, las células inmunes que infiltran el tumor por un lado son capaces de dar lugar a la eliminación de las células tumorales, pero por otro promueven la angiogénesis a nivel tumoral, estimulan la proliferación de las células tumorales, favorecen la invasión tisular y permiten la diseminación metastásica (Coffelt et al., 2010; De Palma et al., 2007; Egeblad et al., 2010; Joyce y Pollard, 2009; Mantovani, 2010; Mantovani et al., 2008; Murdoch et al., 2008; Qian y Pollard, 2010) (Figura 3).

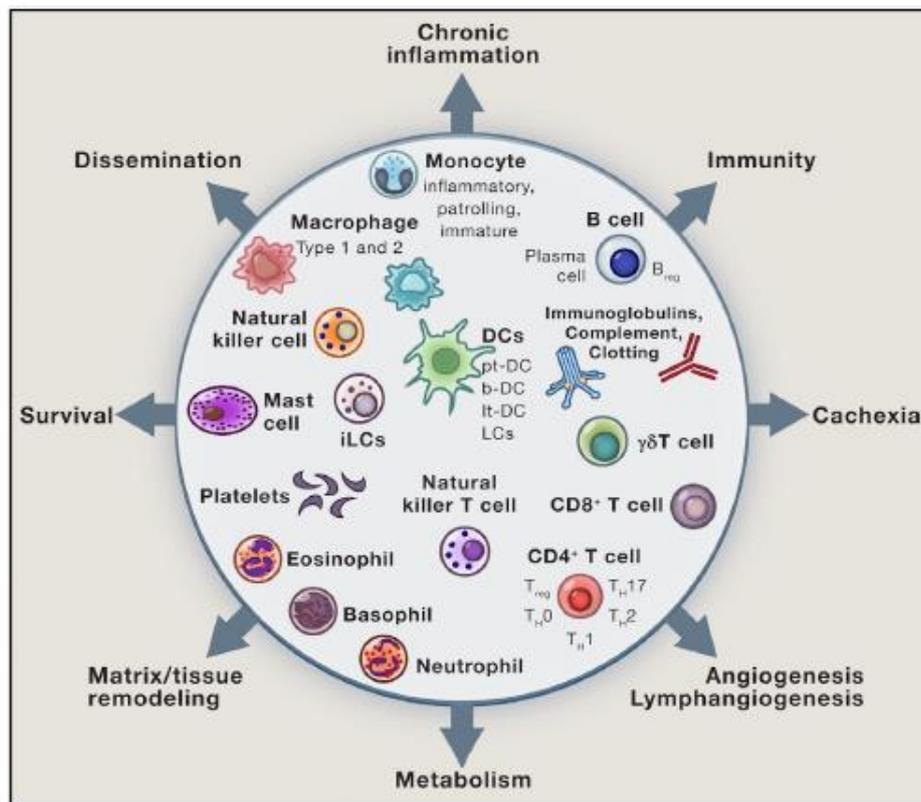


Figura 3. El sistema inmune en el cáncer. El desarrollo del cáncer es determinado por interacciones multifactoriales entre diferentes componentes del microambiente tumoral. Los posibles resultados de estas interacciones son numerosos y dramáticamente opuestos. Estos incluyen la eliminación de las células tumorales por el sistema inmune, la supervivencia de las células tumorales y el consecuente desarrollo tumoral, promovido por la inflamación crónica y los procesos asociados de remodelación de tejido y cambios metabólicos, y la diseminación metastásica, que es favorecida por diferentes procesos, entre ellos la angiogénesis. *Extraído y modificado de Palucka y Coussens, 2016.*

Inflamasoma y cáncer

Como se mencionó anteriormente, la inflamación es un componente central en la respuesta inmunitaria frente al cáncer, y en este proceso los inflamasomas son fundamentales. Existen diferentes tipos de inflamasomas, que varían en sus componentes y en su forma de activación (He et al., 2018). A pesar de esto, todos se caracterizan por formar complejos proteicos oligoméricos tras el

reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés, *Pathogen Associated Molecular Patterns*) y/o a daño (DAMPs, del inglés, *Damage Associated Molecular Patterns*), que sirven como una plataforma para la activación de la caspasa-1, dando lugar a la maduración y secreción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β e IL-18 (Schroder y Tschopp, 2010) y a una forma particular de muerte celular, denominada piroptosis (Strowig et al., 2012).

Los inflamasomas se activan por el reconocimiento de PAMPs o DAMPs, lo cual lleva a la oligomerización de receptores NLR (receptores de tipo NOD, del inglés, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-Like Receptors*) o AIM2 (ausente en melanoma 2, del inglés, *Absent In Melanoma 2*), y su subsecuente interacción con la proteína adaptadora ASC (proteína de tipo speck asociada a la apoptosis que contiene CARD, del inglés, *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*), la cual a su vez interacciona con el dominio CARD (dominio de activación y reclutamiento de la caspasa, del inglés, *Caspase Activation and Recruitment Domain*) de la pro caspasa-1. Esto ocasiona el clivaje autocatalítico de la pro-caspasa-1, para dar lugar a la forma activa de dicha proteasa. La caspasa-1 activa es capaz de clivar las formas inactivas de las IL-1 β e IL-18 (pro IL-1 β y pro IL-18), para generar las IL-1 β e IL-18 pro-inflamatorias (Schroder y Tschopp, 2010; Zhiyu et al., 2016). Esta forma de activación de los inflamasomas se conoce como canónica. Existe una forma alternativa de activación de estos complejos, denominada no canónica, en la cual participan las caspasas 11 y 8 (Viganò et al., 2015); la caspasa-11 es capaz de desencadenar la maduración de la IL-1 β a través de la activación de la gasdermina D (Kayagaki et al., 2015),

mientras que la caspasa-8 actúa como convertidora de la IL-1 β (Antonopoulos et al., 2013; Antonopoulos et al., 2015; Gurung et al., 2014).

Dentro de los inflamasomas, el más estudiado debido a sus posibles funciones en varias patologías humanas incluyendo el cáncer, y en el que me centraré en el presente trabajo, corresponde al inflamasoma NLRP3. El inflamasoma NLRP3 forma parte de los inflamasomas que contienen receptores NLR (Ting et al., 2008), y el mismo puede ser activado por ATP, toxinas y productos bacterianos, ácidos nucleicos, material particulado, entre otros (Dowling y O'Neill, 2012; Franchi et al., 2014; Mariathasan et al., 2006; Sha et al., 2014). Debido a la naturaleza química tan diversa de los activadores de este inflamasoma, se ha planteado que los mismos no interaccionan directamente con el receptor NLRP3, si no que en su lugar inducen ciertos eventos celulares y estos son sentidos por NLRP3. Dentro de estos eventos se han propuesto el eflujo de K⁺, la señalización por Ca²⁺, las especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés, *Reactive Oxygen Species*), la disfunción mitocondrial y la ruptura lisosomal (He et al., 2016).

El mecanismo planteado para la activación del inflamasoma NLRP3 consta de dos pasos. Una primera señal induce la expresión de NLRP3, pro-IL-1 β y pro-IL-18, a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, del inglés, *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), y una segunda señal da lugar a la oligomerización de NLRP3, lo cual, mediante el mecanismo que se explicó previamente, culmina en la activación de la caspasa-1 y la consecuente maduración de IL-1 β e IL-18. Las señales para ambos pasos de la

activación están dadas por diversos PAMPs y DAMPs (He et al., 2016) (Figura 4).

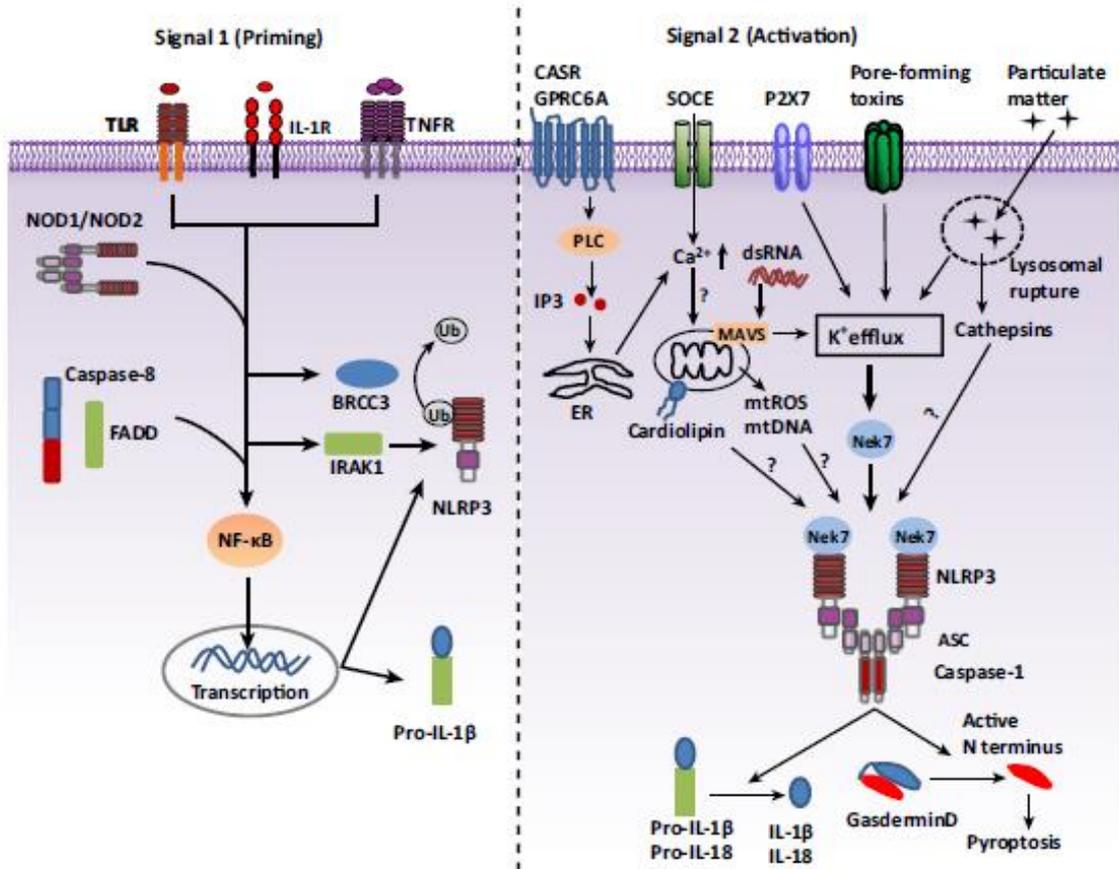


Figura 4. Activación del inflamasoma NLRP3. La activación del inflamasoma NLRP3 se da mediante dos señales, una primera señal que lleva a la síntesis de NLRP3, pro-IL-1 β y pro-IL-18, y una segunda señal que desencadena la oligomerización de NLRP3, lo cual lleva a la activación de caspasa-1 y la subsecuente maduración de pro-IL-1 β y pro-IL-18 a sus formas pro-inflamatorias activas. Las señales de activación para ambos pasos son dadas por una gran variedad de PAMPs y DAMPs, aunque se propone que en el caso de la segunda señal lo que es reconocido por NLRP3 no son estos ligandos, si no cambios celulares generados por los mismos. *Extraído y modificado de He et al., 2016.*

Existe una gran cantidad de evidencia que sugiere que los inflamasomas se encuentran correlacionados con el desarrollo del cáncer. Sin embargo, dichos complejos poseen un rol controversial esta enfermedad, posiblemente debido a

la funcionalidad dual propia de los inflammasomas, los cuales por un lado pueden promover la inflamación carcinogénica por la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, y por otro son capaces de eliminar células malignas a través de la piroptosis y/o la activación de células efectoras anti-tumorales (Zhiyu et al., 2016). Estas diferentes acciones de los inflammasomas se desencadenan según el contexto en el que se activan, el cual a su vez depende de la heterogeneidad de las células tumorales y los diferentes tipos celulares que pueden asociarse a estas en el TME, las diversas moléculas de señalización presentes en este microambiente (Coussens et al., 2013; Grivennikov et al., 2010), e incluso la microbiota del individuo que se encuentra cursando la enfermedad (Kantono y Guo, 2017).

La asociación entre el rol de los inflammasomas en el desarrollo tumoral y el contexto en el que estos se activan se ha evidenciado por el hecho de que la actividad pro-tumoral o anti-tumoral de estos complejos depende significativamente del tipo de cáncer (He et al., 2018; Kantono y Guo, 2017). A pesar de esto, también existe evidencia de que incluso en el mismo tipo de cáncer los inflammasomas juegan roles contrastantes (He et al., 2018). En lo que respecta a esto, se ha observado un aumento en la activación del inflammasoma NLRP3 en diferentes cánceres de pulmón (Kong et al., 2015; Li et al., 2015), donde la producción aumentada de IL-1 β debida a esta sobre-activación favorece la proliferación y la metástasis de las células tumorales (Sorrentino et al., 2015; Wang et al., 2014; Wang et al., 2016). En el cáncer de mama, la activación del inflammasoma NLRP3 es capaz de promover la función anti-tumoral al inducir la secreción de IL-1 β por las DCs (Ghiringhelli et al., 2009). Sin

embargo, se ha demostrado que la IL-1 β también posee una función pro-tumoral en este tipo de cáncer, ya que los niveles aumentados de dicha citoquina en suero se asocian con la recurrencia del cáncer, y la misma es crítica para la angiogénesis, el crecimiento, la progresión y el relapso tumoral (Han et al., 2014; Soria et al., 2011; Voronov et al., 2003). Por su parte, la IL-18 parece poseer un efecto positivo en los tratamientos para el cáncer de mama, ya que es capaz de suprimir la proliferación, migración e invasión de las células tumorales (Liu et al., 2015; Sun et al., 2014). En el caso del cáncer de hígado se ha observado una disminución en la expresión de los componentes del inflamasoma NLRP3 durante el desarrollo de la enfermedad (Wei et al., 2014), aunque también se ha descrito un rol pro-tumoral de dicho inflamasoma en este tipo de cáncer (Yan et al., 2012). En el cáncer colorectal, el inflamasoma NLRP3 contribuye a la metástasis de las células tumorales, ya que induce la transición epitelio-mesénquima de las mismas (Wang et al., 2016), pese a que también se ha demostrado que la secreción de IL-18 desencadenada por la activación de este inflamasoma suprime la metástasis del cáncer colorectal en el hígado, mediante la promoción de la actividad anti-tumoral de células NK (Dupaul-Chicoine et al., 2015). Estos son algunos de los casos donde se observa el rol dual de los inflamasomas en el cáncer; otros tipos de cáncer en los cuales se ha reportado este fenómeno incluyen el cáncer de próstata y los glioblastomas (He et al., 2018).

Puntos de control inmunológico y su rol en las terapias anti-tumorales

Debido a la importancia que tiene el cáncer en la salud humana, y a que aún hoy permanece como una enfermedad incurable para la mayor parte de los pacientes, a lo largo de los años se han desarrollado diversas herramientas para combatir a las células tumorales (Sharma et al., 2017).

Sobre la base del rol fundamental del sistema inmunológico en la eliminación de las células tumorales, uno de los enfoques que se ha investigado en las últimas décadas son las terapias que involucran la acción de dicho sistema, las denominadas inmunoterapias. Los primeros desarrollos de este tipo de terapias se basaron en la estimulación de la inmunidad mediada por las células T, sin embargo, los tratamientos iniciales fallaban en dar una respuesta clínica (Sharma y Allison, 2015). Esto llevó al descubrimiento de la presencia de diversas vías en el sistema inmunológico capaces de regular la activación de las células T, evitando de esta manera el daño sobre los tejidos propios. Dentro de estas vías reguladoras del sistema inmunológico se encontraron mecanismos extrínsecos propios del microambiente tumoral, como las células Treg (Sakaguchi, et al., 1995), y los metabolitos derivados del triptófano (Munn et al., 1998; Uyttenhove et al., 2003), entre otros, que pueden disminuir la respuesta anti-tumoral. Adicionalmente, se describieron mecanismos intrínsecos de las células T que evitan su activación frente a lo propio.

De estos descubrimientos y otros posteriores, en lo que refiere a la regulación de la respuesta inmunológica, surgió la idea de puntos de control inmunológicos,

los cuales corresponden a moléculas capaces de regular la respuesta inmunológica. Dos de los puntos de control inmunológico mejor caracterizados son CTLA-4 (antígeno 4 del linfocito T citotóxico, del inglés, *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) (Leach et al., 1996; Walunas et al., 1994), y PD-1 (proteína 1 de muerte celular programada, del inglés, *Programmed Cell Death Protein 1*) (Freeman et al., 2000). Por su parte, CTLA-4 es un homólogo de la molécula CD28, que al igual que esta interacciona con las moléculas CD80 y CD86, aunque con una afinidad mucho mayor. De esta manera, CTLA-4 desplaza la unión de CD28 con CD80 y CD86 durante la sinápsis inmunológica, impidiendo la co-estimulación de los linfocitos T dada por la interacción de estas moléculas, lo cual finalmente resulta en la inhibición de la activación de las células T (Krummel y Allison, 1995; Walunas et al., 1994). La expresión de CTLA-4 comienza durante la activación de las células T, demostrando el rol fisiológico de esta molécula en la detención de la respuesta inmunológica para evitar el daño a los tejidos propios (Sharma y Allison, 2015). En lo que refiere a PD-1, dicha molécula es expresada solo en células T activas, y actúa interfiriendo con la señalización dada por el receptor de las células T (TCR) que permite la activación de los linfocitos T. PD-1 posee dos ligandos, PD-L1 (ligando 1 de muerte programada, del inglés, *Programmed Death-Ligand 1*) , que se expresa en varios tipos celulares, incluyendo células inmunes, epiteliales y endoteliales, y PD-L2 (ligando 2 de muerte programada, del inglés, *Programmed Death-Ligand 2*), expresado predominantemente en células presentadoras de antígenos (Sharma y Allison, 2015).

Debido al rol de estas moléculas en la inhibición de las respuestas inmunológicas, se comenzó a analizar si el bloqueo de las mismas era capaz “soltar los frenos” del sistema inmune, para que este pudiera combatir de forma eficiente a las células tumorales. En este sentido, el bloqueo de CTLA-4, PD-1 y PD-L1 en pacientes con diferentes tipos de cáncer, utilizando anticuerpos monoclonales, dio resultados muy positivos, siendo que la FDA (administración de alimentos y medicamentos, del inglés, *Food and Drug Administration*) aprobó en 2011 el anticuerpo anti-CTLA-4 Ipilimumab como un tratamiento para pacientes con melanoma metastásico, y en 2014 los anticuerpos anti-PD-1 Pembrolizumab y Nivolumab para pacientes con melanoma metastásico, y en el caso de este último también para pacientes con cáncer de pulmón avanzado o metastásico (Sharma y Allison, 2015). Adicionalmente, dado que CTLA-4 y PD-1 regulan diferentes vías inhibitorias en las células T, se han desarrollado tratamientos con combinaciones de estos anticuerpos, que demostraron mejorar las respuestas anti-tumorales (Curran et al., 2010; Hellmann et al., 2017). A pesar de estos resultados prometedores, solo una minoría de los pacientes tratados se ha visto beneficiado por el efecto de dichos anticuerpos, posiblemente por la existencia de diferentes mecanismos de resistencia a estas inmunoterapias (Sharma et al., 2017). Por este motivo, con la finalidad de vencer los diversos mecanismos de resistencia, en los últimos años se han comenzado a caracterizar nuevos puntos de control inmunológicos y a analizar su relevancia en el cáncer.

Tmem176b

Un punto de control inmunológico recientemente identificado es la proteína Tmem176b, también conocida como TORID (TOLernace Related and InduceD). Tmem176b forma parte de la familia de proteínas transmembrana MS4A (Louvet et al., 2005) y funciona como un canal iónico en la membrana de fagosomas (Segovia et al., 2014). Esto le permite a la proteína cumplir la función de regular el pH fagosomal en las células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDCs), controlando así la vía de presentación cruzada de antígenos a través de moléculas del MHC clase I (Segovia et al., 2014).

Tmem176b se encuentra expresada en pulmón, riñón, ganglios linfáticos y bazo, con una gran expresión en BMDCs, así como en DCs convencionales y plasmacitoides, granulocitos y monocitos (Condamine et al., 2010). Su expresión se ha asociado al estado inmaduro de monocitos y DCs, disminuyendo tras la estimulación inflamatoria (Condamine et al., 2010). Un estudio llevado a cabo por Anandasabapathy y colaboradores demostró que Tmem176b se encuentra sobre-expresada en DCs migratorias que inhiben la respuesta inmune a vacunas (Anandasabapathy et al., 2014).

Tmem176b se ha asociado a la tolerancia inmunológica en modelos de trasplante de órganos (Louvet et al., 2005), y se demostró que dicha proteína es esencial para la generación de células Treg CD8⁺CD11c⁺ en un modelo de trasplante, inhibiendo el rechazo del mismo (Segovia et al., 2014). Por otra parte, Tmem176b se encuentra asociada con el cáncer, presentando una acumulación anormal en determinados tipos de cáncer (Cuajungco et al., 2012), así como en

células endoteliales tumorales (Otsubo et al., 2014). Estos hallazgos indicarían que dicha proteína tiene un rol en la regulación del sistema inmune, por lo cual podría actuar como un punto de control inmunológico. En este sentido, resultados previos de nuestro laboratorio mostraron una asociación de *Tmem176b* con la progresión tumoral. Observamos que ratones deficientes en dicha proteína presentan un crecimiento tumoral más lento y una mayor supervivencia que ratones WT (salvajes, del inglés, *Wild Type*) en dos modelos de tumor trasplantable (Russo, 2015).

El estudio del microambiente tumoral y los ganglios linfáticos drenantes del tumor de ratones *Tmem176b*^{-/-} y WT reveló que los ratones deficientes en *Tmem176b* poseen un aumento de células TCD8⁺ totales y específicas del tumor, así como un aumento de células T CD4⁺RORγt⁺ en el tumor, y una disminución de moléculas relacionadas a la regulación de la respuesta inmune (FoxP3, CTLA-4, CCL22) en el ganglio linfático que drena el tumor. Adicionalmente se observó un aumento en la activación del inflamasoma NLRP3 *in vivo* en los ratones *Tmem176b*^{-/-}, que ocasiona un incremento en la expresión de IL-1β en estos ratones respecto a los WT (Russo, 2015); esta activación diferencial del inflamasoma podría explicar las diferencias en la supervivencia de ambos grupos.

Indoleamina 2,3-dioxigenasa

Otro punto de control inmunológico que ha cobrado importancia en los últimos años es la enzima indoleamina 2,3 – dioxigenasa 1 (IDO1), la cual es capaz de degradar el triptófano por la vía de la quinurenina (Higuchi y Hayaishi, 1967; Shimizu et al., 1978). La depleción de triptófano tras la conversión a quinurenina

por IDO1 en el microambiente tumoral ha emergido como un factor fundamental en la inmunosupresión que se lleva a cabo en el tumor, dado que IDO1 se encuentra expresada de forma aberrante en diferentes tumores (McGaha et al., 2012; Van Baren y Van den Eynde, 2015). Este efecto inmunosupresor se debe a diversos mecanismos, entre ellos el arresto de la proliferación de linfocitos T dado por la falta de triptófano, la apoptosis de las células T y la inducción de células Treg mediada por los catabolitos del triptófano (Cobbold et al., 2009; Munn et al., 2005; Terness et al., 2002). En humanos, la expresión de esta enzima se encuentra restringida a ciertos grupos celulares, como las DCs maduras y las células endoteliales de la placenta. El rol de esta enzima en las DCs parecería ser el de contribuir al control de la respuesta inmune (Theate et al., 2015), por ejemplo, dando lugar a la expansión de células Treg (Hill et al., 2007) (Figura 5).

Se ha demostrado que la expresión de IDO1 puede inducirse tras estímulos pro-inflamatorios, como el IFN γ (interferón γ) (Chon et al., 1996; Konan y Taylor, 1996) y el LPS (lipopolisacárido) (Hwu et al., 2000; Jung et al., 2007), lo cual asegura un *feedback* negativo en las respuestas inmunológicas.

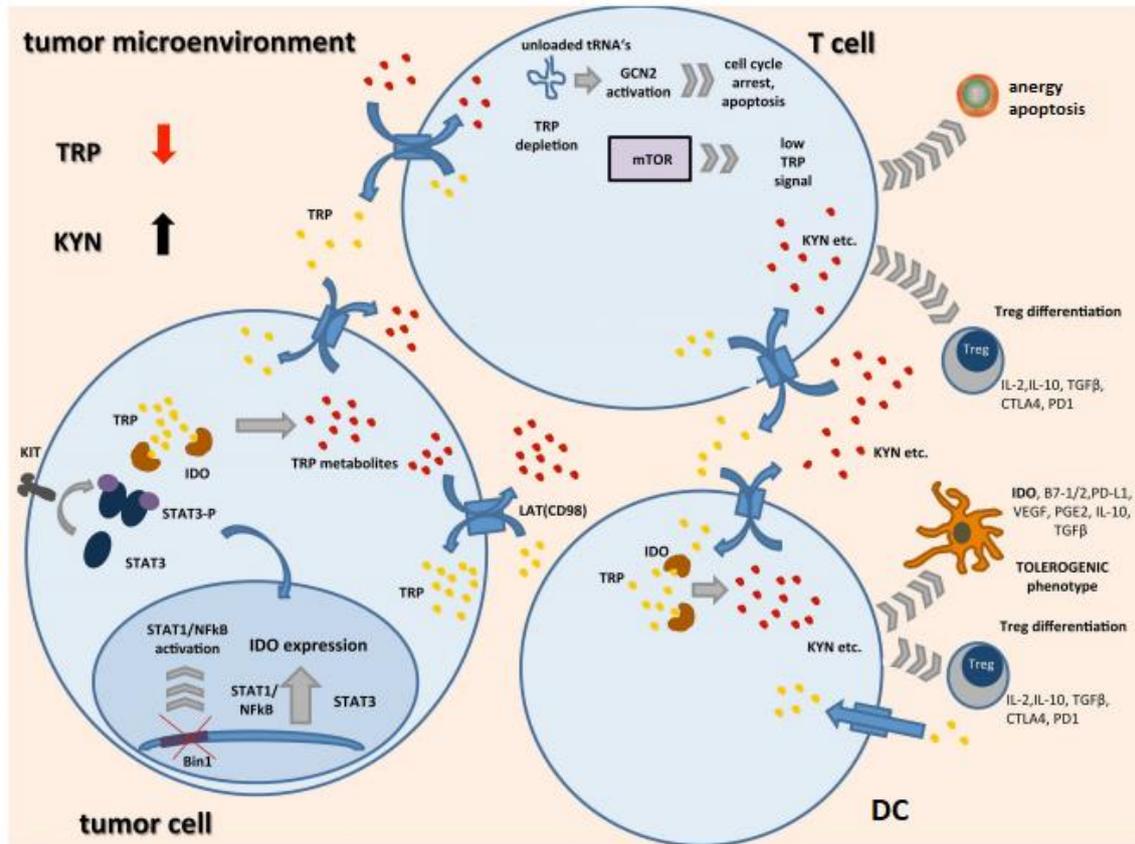


Figura 5. Acción de la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO1) en el microambiente tumoral. La expresión de IDO1 en el microambiente tumoral por las células tumorales y las células dendríticas (DCs) ocasiona la depleción del triptófano (TRP, puntos amarillos) y la acumulación de sus metabolitos, entre ellos la quinurenina (KYN, puntos rojos). En las células T, la depleción de triptófano y la acumulación de metabolitos derivados de su degradación llevan a la anergia y la apoptosis de células T efectoras, y a la diferenciación a células T reguladoras (Treg). La expresión de IDO1 por las DCs se asocia a fenotipos reguladores, capaces de dar lugar a la generación de células Treg que impiden la respuesta anti-tumoral. *Extraído y modificado de Platten et al., 2015.*

La inhibición de IDO1 en modelos preclínicos confirmó su rol en el desarrollo tumoral, siendo que dicha inhibición resulta en efectos antitumorales, sinérgicos con varias inmunoterapias (Holmgaard et al., 2013; Koblish et al., 2010; Uyttenhove et al., 2003).

En gran cantidad de tumores humanos, la expresión de IDO1 se asocia a una menor supervivencia y una reducción de la infiltración de linfocitos T (Brandacher,

2006; Inaba et al., 2009; Ino et al., 2008). En los tumores humanos existen dos patrones de la expresión de IDO1 (Theate et al., 2015). En algunos tumores la expresión de IDO1 se encuentra asociada con el infiltrado de células T y la inflamación (Topalian et al., 2015), mientras que existen otros que expresan IDO1 en ausencia de estos factores, lo cual representa una resistencia inmune intrínseca del tumor frente al ataque por el sistema inmunológico (Theate et al., 2015; Van Baren y Van den Eynde, 2015). Estos últimos se conocen como tumores “fríos” o no inflamatorios, y son clínicamente relevantes en el sentido que suelen fallar en responder a tratamientos de bloqueo de puntos de control inmunológicos (Hennequart et al., 2017). En lo que respecta a esto, Hennequart y colaboradores, describieron ciertas vías que podrían estar asociadas a la expresión constitutiva de IDO1 por los tumores. Entre varios de sus hallazgos los autores observaron que esto puede ser controlado por la IL-1 β , la cual parece promover el aumento en la expresión de dicha enzima en las células tumorales (Hennequart et al., 2017).

Objetivos

De los antecedentes desarrollados anteriormente se desprende que la expresión de IDO1 en los tumores es, en parte, inducida por IL-1 β . A su vez, resultados de nuestro laboratorio muestran que Tmem176b es un inhibidor de la activación del inflamasoma. Nuestra hipótesis de trabajo es que Tmem176b, al regular la activación del inflamasoma, podría estar regulando a su vez la expresión de IDO1.

El objetivo general de este proyecto es el estudio de una potencial relación entre la expresión de IDO1 y Tmem176b. De existir dicha relación, el bloqueo de IDO1 podría tener un efecto sinérgico en la respuesta anti-tumoral dada por la inhibición de Tmem176b.

Objetivos específicos

- Estudio de la expresión de IL-1 β e IDO1 en BMDCs *Tmem176b^{-/-}* y WT.
- Estudio de la expresión y actividad de IDO1 en tumor y ganglio drenante de tumor de ratones *Tmem176b^{-/-}* y WT.

Metodología

Generación y caracterización de BMDCs

Se diferenciaron células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs) de ratones WT y *Tmem176b*^{-/-}, como lo describieron Segovia y colaboradores (Segovia, et al., 2010). Para esto, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron los fémures y tibias, de donde se obtuvo la médula ósea. Se lisaron los glóbulos rojos utilizando solución de lisis de glóbulos rojos (0.15M NH₄Cl, 0.01M KHCO₃ y 100µM Na₂EDTA; pH 7.4) y se cultivaron 5x10⁶ células por placa de Petri de plástico no tratado, en medio RPMI suplementado (10% suero fetal bovino, 1% buffer HEPES, 1% MEM- aminoácidos no esenciales, 1mM piruvato de sodio, 2mM L-glutamina, 100U/mL penicilina, 0.1mg/mL estreptomycin y 0.05mM β-mercaptoetanol) con GM-CSF (factor estimulador de colonia de granulocitos y macrófagos, del inglés, *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) en una dilución 1/10000. Al día 3 de cultivo se agregaron 10mL de medio RPMI suplementado con GM-CSF a cada placa de cultivo. Al día 6 de cultivo se tomaron 10mL de cada de placa, se centrifugaron y las células se re-suspendieron en medio RPMI suplementado con GM-CSF, agregándose 10mL de estas células a cada una de las placas.

Para la caracterización de las BMDCs se analizaron marcadores de diferenciación y maduración (CD11c, MHC clase II, CD80 y CD86) mediante citometría de flujo. Para esto, al día 8 de cultivo de las BMDCs se descartó el sobrenadante de cada placa, y se agregaron a las placas conteniendo las células

adherentes 10mL de medio RPMI suplementado con diferentes concentraciones de LPS (0 y 250ng/mL); el tratamiento se mantuvo durante 24hs a 37°C. Pasadas las 24hs se recuperó el sobrenadante de cultivo, se centrifugó y se obtuvieron las células en suspensión; en paralelo se despegaron las células adherentes utilizando 10mL de PSE (PBS, 2% suero fetal bovino, 0,7mM EDTA) frío. Posteriormente, se mezclaron las células adherentes y en suspensión, y se incubaron $1,5 \times 10^5$ células con 20µL del mix de anticuerpos para los marcadores previamente mencionados, diluidos en PSA (PBS, 0.2% suero fetal bovino, 0.1% azida de sodio) a una concentración de 1µg/mL, durante 20 minutos en hielo. Para las muestras con simple marcado y el control sin marca se utilizaron $1,5 \times 10^5$ células de una mezcla de todas las muestras. Las adquisiciones se realizaron en el citómetro de flujo CyAN ADP Analyzer (Beckman Coulter) y el análisis de las mismas se llevó a cabo con el software FlowJo v.X.

Estudio de la producción de IL-1β en BMDCs mediante ELISA

Se utilizaron BMDCs de ratones *Tmem176b*^{-/-} y WT obtenidas como se describió previamente. Al día 8 de cultivo de las BMDCs se descartó el sobrenadante de las placas y las células adherentes fueron despegadas utilizando PSE frío. En placas de 96 pocillos de fondo plano se cultivaron 100µL de células por pocillo a una concentración de 5×10^5 células/mL, en medio RPMI suplementado, y se dejaron adherir durante 2hs a 37°C. Una vez pasadas las 2hs se descartó el sobrenadante y se agregó a cada pocillo una concentración diferente de LPS (0, 50, 100, 200, 400 u 800ng/mL) diluido en medio RPMI suplementado. Cada

tratamiento se realizó por triplicado. Las placas se mantuvieron 24hs a 37°C para posteriormente obtener el sobrenadante de cultivo, descartando las células no adheridas a la placa y los detritos celulares mediante centrifugación.

Para la determinación de la producción de IL-1 β , el sobrenadante obtenido tras la estimulación se diluyó en solución de dilución (PBS, 10% suero fetal bovino) en una proporción 1/4 para las células *Tmem176b*^{-/-} y 1/2 para las WT. Para este ensayo se utilizó un kit comercial para ELISA de captura de IL-1 β (Bio-Legend Mouse IL-1 β ELISA MAX Standard Set, ref. 432603) y se siguió el protocolo proporcionado por el fabricante. Brevemente, la placa se sensibilizó usando 100 μ L de una dilución 1/200 del anticuerpo de captura durante 24hs a 4°C, se realizó el bloqueo de las placas con 200 μ L de solución de dilución durante 1h a 27°C, y posteriormente se incubó con 100 μ L de la muestra y la curva de calibración (0 -2000 μ g/mL de estándar de IL-1 β de ratón) durante 2h a 27°C. La presencia de IL-1 β se detectó usando 100 μ L de una dilución 1/200 del anticuerpo de detección conjugado a biotina, el cual se incubó 1h a 27°C, para posteriormente agregarse 100 μ L de avidina conjugada a peroxidasa de rábano (HRP, del inglés, *Horseradish Peroxidase*) en una dilución 1/1000 durante 30 minutos a 27°C. La reacción se reveló tras la adición de 50 μ L del sustrato TMB (Sigma-Aldrich, ref. T0440), que se incubó a 27°C protegido de la luz, hasta observarse el virado de color en la curva de la calibración. Dicha reacción se detuvo utilizando 50 μ L de H₃PO₄ 1M, y la absorbancia se midió en un lector de placas a 450nm y 570nm; el valor de absorbancia utilizado para el análisis de las muestras se obtuvo restando la absorbancia a 570nm de la absorbancia a 450nm. La concentración de IL-1 β en las muestras se consiguió interpolando la

absorbancia calculada a la curva de calibración mediante el software GraphPad Prism v.6. El análisis estadístico se realizó por el método Two-Way ANOVA con un alfa de 0.05 en el software GraphPad Prism v.6.

Estudio de la expresión de IDO1 en BMDCs mediante Western Blot

Se utilizaron BMDCs de ratones *Tmem176b^{-/-}* y WT obtenidas como se describió previamente. Al día 8 de cultivo de las BMDCs se descartó el sobrenadante de las placas y se le agregaron a las mismas 10mL de diferentes concentraciones de LPS (0, 50, 100, 200, 400 u 800ng/mL) diluido en medio RPMI suplementado; los tratamientos se mantuvieron 24hs a 37°C. Pasado el tiempo de tratamiento se recolectó el sobrenadante de la placa, y se centrifugó para obtener las células no adheridas a la placa. Las células adheridas fueron despegadas utilizando PSE frío y se mezclaron con las células sobrenadantes. Dichas células se centrifugaron, se lavaron con PBS y se volvieron a centrifugar para obtener un pellet. La lisis del pellet celular se realizó utilizando solución de lisis RIPA e inhibidores de proteasas, y sonicando 3 ciclos de 10 segundos con una amplitud de 10%. El sobrenadante del producto de lisis se obtuvo tras una centrifugación de 10 minutos a 10000 rpm.

Las muestras obtenidas se cuantificaron mediante la técnica del ácido bicinconinico (BCA), y posteriormente 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) e hirvieron a 100°C durante 5 minutos.

Para la puesta a punto del Western Blot anti-IDO1 se sembraron 50µg de proteína en un gel de poliacrilamida al 8% desnaturalizante (SDS-PAGE). La corrida electroforética se realizó a 150V hasta perder el frente de corrida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por electrotransferencia semi seca a 20V durante 30 minutos, y la membrana se tiñó con Rojo Ponceau (0.1% Ponceau S, 1% ácido acético) para corroborar la correcta transferencia de las muestras. Posteriormente la membrana se bloqueó durante 2hs a temperatura ambiente con TBS-Tween 0.1%-Leche 5%, se lavó con TBS-Tween 0.1% y se incubó con 1µg/mL de anticuerpo monoclonal de rata anti-IDO1 de ratón (m-IDO48, Bio-Legend, ref.122402), diluido en TBS-Tween 0.1%- Leche 1%, toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 0.1% y se incubó la membrana 1h a temperatura ambiente con diferentes anticuerpos secundarios diluidos en TBS-Tween 0.1%- Leche 1%: 1) 1µg/mL de ratón anti-rata conjugado a biotina (Jackson Immuno Research Laboratories, ref. 212066168); 2) 1µg/mL de burro anti-rata conjugado a HRP (Jackson Immuno Research Laboratories, ref. 712035153). A este paso le siguieron 4 lavados con TBS-Tween 0.1%. En el caso de la condición 1 se realizó una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente con 1µg/mL de estreptavidina conjugada a HRP (Life Technologies, ref. S911), diluida en TBS-Tween 0.1%- Leche 1%, y se lavó la membrana 6 veces con TBS-Tween 0.1%. El revelado se realizó mediante quimioluminiscencia, utilizando el sustrato SuperSignal West Pico (Thermo Scientific, ref. 34080). Una vez se determinó la condición óptima del anticuerpo secundario, la misma fue utilizada en la realización de los Western Blot para analizar la expresión de IDO1 en las BMDCs.

Para la normalización de la expresión de IDO1 se utilizó la proteína de expresión constitutiva gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, del inglés, *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*). Para esto, luego del revelado del Western Blot anti-IDO1, la membrana se “strippeó” durante 15 minutos a temperatura ambiente con guanidina 7M, se lavó durante 5 minutos con agua destilada y posteriormente con TBS-Tween 0.1%. Se realizó el bloqueo con TBS-Tween 0.1%-Leche 5% a 4°C toda la noche con agitación, se lavó la membrana con TBS-Tween 0.1% y se incubó con 0.2 µg/mL de anticuerpo de conejo anti-GAPDH (Sigma-Aldrich, ref. G9545), diluido en TBS-Tween 0.1%- Leche 1%, 1h a temperatura ambiente. Luego, la membrana se lavó 3 veces con TBS-Tween 0.1% y se incubó con 1µg/mL de anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado a HRP (Sigma-Aldrich, ref.A0545), diluido en TBS-Tween 0.1%- Leche 1%, durante 1h a temperatura ambiente. El revelado se llevó a cabo por quimioluminiscencia utilizando el sustrato Pierce ECL (Thermo Scientific, ref. 32106), y la cuantificación se hizo utilizando el software ImageJ v.1.5i. El análisis estadístico de los niveles de expresión normalizados se realizó mediante el test Two-Way ANOVA con un alfa de 0.05 en el software GraphPad Prism v.6.

Desarrollo tumoral en ratones

Para el desarrollo tumoral se utilizó la línea celular derivada de linfoma tímico de ratón EG7-OVA. Estas células se cultivaron en medio DMEM suplementado (10% suero fetal bovino, 1% buffer HEPES, 1% MEM- aminoácidos no esenciales, 1mM piruvato de sodio, 100U/mL penicilina, 0.1mg/mL

estreptomicina, 0.05mM β -mercaptoetanol y 0.4 mg/mL de geneticina). Para el modelo de cáncer transplantable se inyectaron por vía subcutánea 5×10^5 células EG7-OVA a ratones *Tmem176b^{-/-}* y WT. Al día 14 post inyección se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se les resecó el tumor y el ganglio linfático drenante del tumor para procesar para Western Blot, RT-PCR cuantitativa y ensayo de producción de quinurenina.

Estudio de la expresión de IDO1 en tumores y ganglios drenantes del tumor

Western Blot

Los tumores y los ganglios drenantes del tumor se disgregaron y lisaron con un Potter en solución de lisis RIPA con inhibidores de proteasas. Posteriormente, las muestras se sonicaron durante 6 ciclos de 10 segundos con una amplitud de 10%, y se recuperó la fase acuosa del producto de lisis tras una centrifugación de 10 minutos a 10000 rpm. Las muestras se cuantificaron mediante la técnica de BCA, 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 a 100°C durante 5 minutos. Para el Western Blot se utilizó el procedimiento previamente descrito para las BMDCs, empleando la condición óptima de anticuerpo secundario obtenida en la puesta a punto mencionada para dichas muestras. Al igual que para las BMDCs, la normalización de la expresión de IDO1 se efectuó utilizando la expresión de GAPDH, llevando a cabo el mismo

procedimiento descrito previamente. La cuantificación se efectuó mediante el software ImageJ v.1.5i y para el análisis estadístico se realizó el test de Mann-Whitney en el software GraphPad Prism v.6.

RT-PCR cuantitativa

Se extrajo el ARN de los tumores y ganglios drenantes del tumor mediante la técnica del Trizol-Cloroformo. Brevemente, el tumor o ganglio se disgregó en un Potter con 500µL de Trizol y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 100µL de cloroformo, se mezcló con vortex 30 segundos, y se dejó 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000g durante 15 minutos a 4°C, y se recuperó la fase acuosa superior. Se agregaron 250 µL de isopropanol, se agitó suavemente, y se almacenó a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente, las muestras se mantuvieron 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron a 12000g por 20 minutos a 4°C. El pellet se lavó 2 veces con etanol 75%, centrifugando a 7500g por 5 minutos a 4°C cada vez. Una vez seco, el pellet se re-suspendió en 25µL de agua ultra pura libre de ARNsas y ADNsas.

El ARN se cuantificó mediante Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) y se realizó la retrotranscripción de 2µg de ARN, utilizando oligo(dT)s y la transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen, ref.18064-14).

Una vez obtenido el ADNc se llevó a cabo la PCR cuantitativa de Ido1, utilizando los cebadores directo 5'-CAGGCCAGAGCAGCATCTTC-3' y reverso 5'-GCCAGCCTCGTGTTTTATTCC-3', y el gen normalizador Gapdh, empleando

los cebadores directo 5'-CTACAGCAACAGGGTGGTGG-3' y reverso 5'-TATGGGGGTCTGGGATGG-3'. Para esto, se sembraron 4µL de ADNc con 6µL de cada mix (Ido1 o Gapdh) conteniendo 10µM de cebadores, BSA 25mg/mL y SYBR Green Master Mix (Roche, ref.28137500). A cada experimento se le agregó un calibrador (ADNc de esplenocitos activados con concavalina A), y un control negativo (agua ultra pura libre de ARNsas y ADNsas). Para efectuar el ciclado de la PCR se utilizó el equipo Eco Real Time-PCR System (Illumina).

La expresión relativa de Ido1 se determinó como $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, que se define como la relación de la expresión del gen en la muestra respecto a la del calibrador. El $\Delta\Delta Ct$ se calculó como $(Ct_{Ido1 \text{ muestra}} - Ct_{Gapdh \text{ muestra}}) - (Ct_{Ido1 \text{ calibrador}} - Ct_{Gapdh \text{ calibrador}})$, siendo Ct el ciclo de la PCR en el cual se detecta la señal de fluorescencia de la muestra, correlacionándose de forma inversa a la cantidad de ADN presente. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Mann-Whitney en el software GraphPad Prism v.6.

Análisis de la producción de quinurenina en tumores

Se disgregaron y lisaron los tumores de ratones WT y *Tmem176b*^{-/-} como se explicó anteriormente, obteniéndose la fase acuosa del producto de lisis, el cual se cuantificó por la técnica de BCA. El análisis para determinar la presencia de quinurenina en estos lisados se realizó utilizando el método del reactivo de Ehrlich (Takikawa et al., 1988). Brevemente, 150µL del lisado se agregaron a un tubo eppendorf junto a 75µL de ácido tricloroacético 30% frío, se mezcló con

vortex, y se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Este mismo procedimiento se realizó para L-quinurenina comercial (Sigma-Aldrich, ref. K8625), en concentraciones de 0 a 100µM, para realizar una curva de calibración. Posteriormente se recuperaron 150µL del sobrenadante, se agregaron a una placa de 96 pocillos y se adicionaron 150µL del reactivo de Ehrlich (2% de 4-(Dimetilamino) benzaldehído en ácido acético glacial). La reacción se incubó 15 minutos a temperatura ambiente tapada de la luz, y pasado este tiempo se midió la absorbancia a 492nm. La concentración de quinurenina en las muestras se obtuvo interpolando la absorbancia a la curva de calibración mediante el software GraphPad Prism v.6., y se normalizó por la cantidad de proteína presente en cada muestra. El análisis estadístico se realizó mediante el test de Mann-Whitney en el software GraphPad Prism v.6.

Resultados y Discusión

Estudio de la expresión de IL-1 β e IDO1 en BMDCs *Tmem176b*^{-/-} y WT

Caracterización de BMDCs

Para llevar a cabo el primer objetivo de este trabajo se generaron BMDCs provenientes de ratones WT y *Tmem176b*^{-/-} como se describió previamente. Para verificar la correcta diferenciación de las BMDCs se realizó la caracterización de las mismas mediante citometría de flujo, utilizando los marcadores de diferenciación y maduración de esta población (CD11c, MHCII, CD80 y CD86).

Tanto en las células derivadas de ratones WT como de ratones *Tmem176b*^{-/-}, observamos una población de células CD11c⁺ correspondientes a las BMDCs, cuyo porcentaje fue mayor al 90% (Figura 6), indicando que se logró una correcta diferenciación. Por otro lado, dentro de las células CD11c⁺ WT y *Tmem176b*^{-/-} obtuvimos aproximadamente un 50% de células MHCII⁺, 70% de células CD80⁺ y 3% de células CD86⁺ (Figura 6), lo cual coincide con lo esperado según la bibliografía para este protocolo de diferenciación de BMDCs (Segovia et al., 2010).

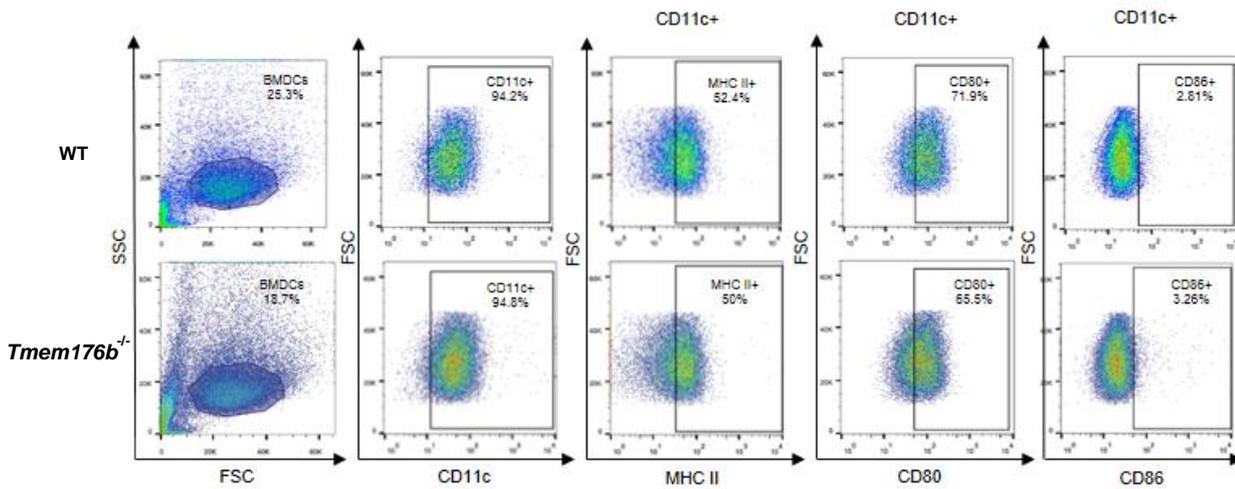


Figura 6. Caracterización de BMDCs mediante citometría de flujo. BMDCs provenientes de ratones WT y *Tmem176b*^{-/-} se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la presencia de marcadores de diferenciación y maduración característicos (CD11c, MHCII, CD80 y CD86). Se seleccionaron las células en base a su tamaño y complejidad, se descartaron los dobletes y multipletes y se determinó el porcentaje de células CD11c⁺, y dentro de esta población las células MHCII⁺, CD80⁺ y CD86⁺.

Adicionalmente, buscamos determinar si estas BMDCs eran capaces de madurar al tratarlas con LPS. Para esto, al día 8 de cultivo se estimularon las BMDCs con 0 y 250ng/mL de LPS durante 24hs, y mediante citometría de flujo se evaluó si se daba un aumento en la expresión de MHCII y los co-estimuladores CD80 y CD86, lo cual es característico de la maduración de las células dendríticas.

En primer lugar evaluamos si tras la estimulación con 250ng/mL de LPS aumentaba el porcentaje de células MHCII⁺CD80⁺ y MHCII⁺CD86⁺, dentro de las células CD11c⁺, para determinar si dicho estímulo ocasionaba la maduración de las BMDCs respecto al control (0ng/mL de LPS). Tanto en las BMDCs WT como en las *Tmem176b*^{-/-}, observamos un aumento en el porcentaje de células

MHCII⁺CD80⁺ y MHCII⁺CD86⁺, siendo dicho incremento mucho más pronunciado en la segunda población (Figura 7A).

Por otro lado, investigamos si el tratamiento con 250ng/mL de LPS llevaba a un aumento en los niveles de expresión de MHCII, CD80 y CD86 en las BMDCs CD11c⁺, midiendo la variación en la intensidad de fluorescencia media (MFI, del inglés, *Mean Fluorescence Intensity*) de estos marcadores respecto al control. Evidenciamos un aumento en la expresión de CD80 y CD86, con un incremento mucho más marcado en el caso de CD86, que pudo haberse debido al bajo nivel de expresión inicial de dicha molécula, ya que la MFI alcanzada tras la estimulación fue semejante a la obtenida para CD80 (Figura 7B y 7C). Este resultado podría explicarse por las diferencias en la cinética de la expresión de ambos co-estimuladores. Se ha demostrado que CD80 se expresa en células dendríticas inmaduras en mayor proporción que CD86 y que, tras estímulos inflamatorios como el LPS, CD86 es capaz de inducirse más tempranamente que CD80 y de forma más pronunciada (Chambers, 2001; Sansom et al., 2003; Zheng et al., 2004; Bhatia et al., 2006). En lo que respecta al MHCII, no observamos una diferencia en la MFI al tratar las BMDCs con 250ng/mL de LPS (Figura 7B y 7C), aunque esperábamos que el estímulo fuera capaz de aumentar la expresión de esta molécula. Una posible explicación para la imposibilidad del LPS de generar un aumento en la expresión de MHCII en estas BMDCs puede surgir del hecho de que las BMDCs generadas con baja concentración de GM-CSF, como es el caso en este trabajo, tienen cierta resistencia a la maduración (Lutz et al., 2000).

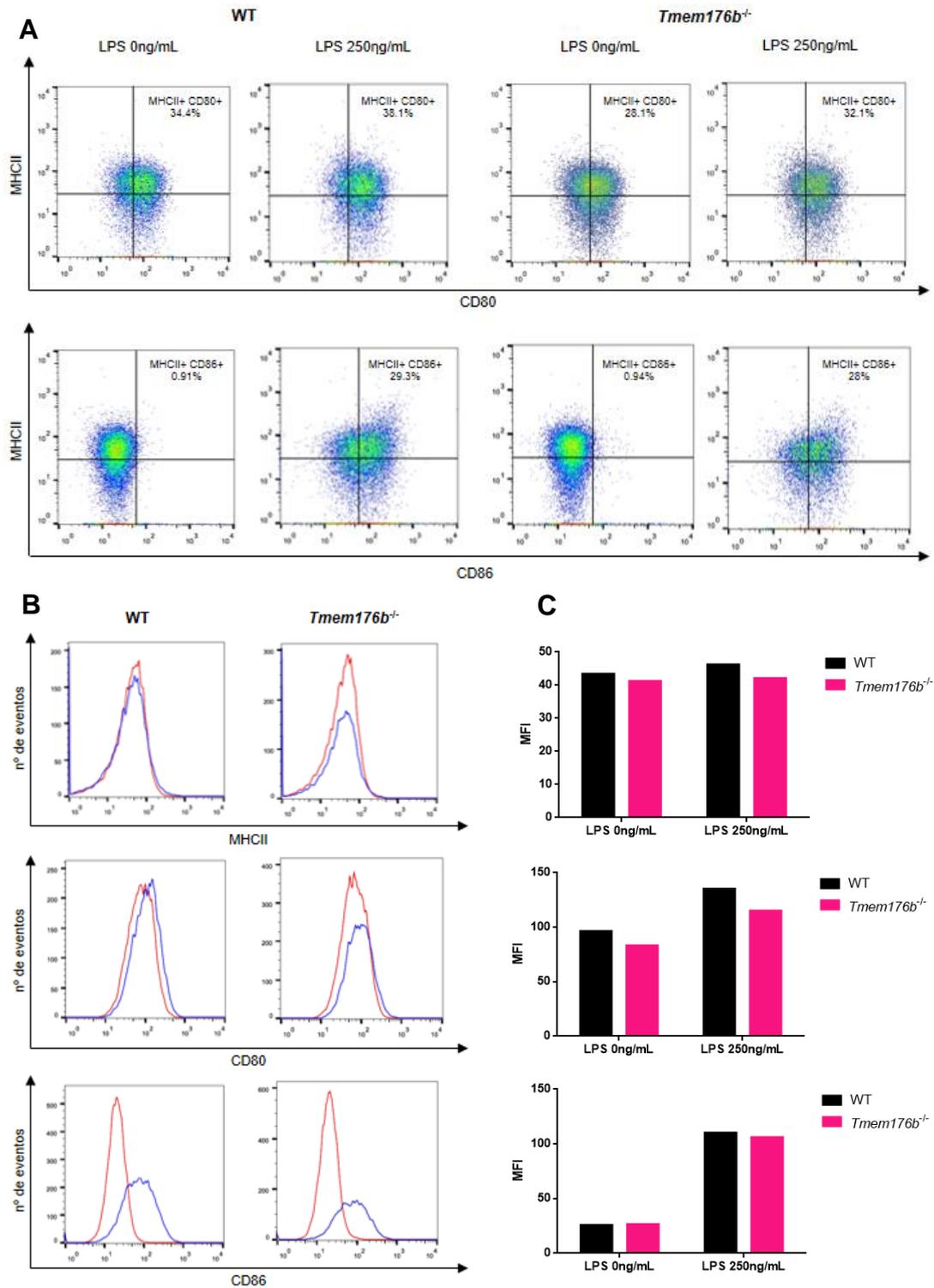


Figura 7. Análisis de la expresión de MHCII, CD80 y CD86 en BMDCs mediante citometría de flujo. BMDCs provenientes de ratones WT y *Tmem176b*^{-/-} se estimularon 24hs con 0 o 250ng/mL de LPS, y mediante citometría de flujo se analizaron las diferencias en la expresión de los marcadores MHCII, CD80 y CD86 dentro de las células CD11c⁺. A) Dot plot con las proporciones de células MHCII⁺CD80⁺ (arriba) y MHCII⁺CD86⁺ (abajo) B) Histogramas representando los niveles de expresión de MHCII (arriba), CD80 (medio) y CD86 (abajo). En rojo se muestra la curva correspondiente al tratamiento con 0ng/mL de LPS y en azul con 250ng/mL. C) Intesidad de fluorescencia media (MFI) para MHCII (arriba), CD80 (medio) y CD86 (abajo).

Los resultados obtenidos demuestran que se pudieron generar y diferenciar BMDCs de forma correcta, y que estas células fueron capaces de adquirir un fenotipo asociado al estado de madurez tras el estímulo con LPS, al menos en cierta medida, como se evidenció por el incremento de células MHCII⁺CD80⁺ y MHCII⁺CD86⁺, y el aumento en la expresión de las moléculas co-estimuladoras.

*Producción de IL-1 β por BMDCs *Tmem176b*^{-/-} y WT*

Una vez demostrada la correcta generación de las BMDCs, decidimos confirmar que las BMDCs *Tmem176b*^{-/-} fueran capaces de producir mayores niveles de IL-1 β que las BMDCs WT tras la estimulación *in vitro* con LPS, ya que como hemos demostrado previamente en nuestro laboratorio, *Tmem176b* es capaz de regular la activación del inflamasoma. Para esto, las BMDCs WT y *Tmem176b*^{-/-} se trataron al día 8 de cultivo con 0, 50, 100, 200, 400 u 800 η g/mL de LPS durante 24hs para inducir la activación del inflamasoma. Una vez pasadas las 24hs se evaluó la producción de IL-1 β en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA.

Observamos, tanto para las BMDCs WT como para las *Tmem176b*^{-/-}, un aumento en la producción de IL-1 β de forma dosis dependiente, para las concentraciones de LPS de 0, 50, 100, 200 y 400 η g/mL, (Figura 8). Por otro lado, evidenciamos en todos los tratamientos con LPS que las BMDCs derivadas de ratones *Tmem176b*^{-/-} produjeron una mayor concentración de IL-1 β que aquellas derivadas de los ratones WT, aunque dicha diferencia solo fue significativa para los tratamientos con 200 y 400 η g/mL de LPS ($p \leq 0.01$ para 200 η g/mL y $p \leq 0.001$ para 400 η g/mL, Two-Way ANOVA) (Figura 8).

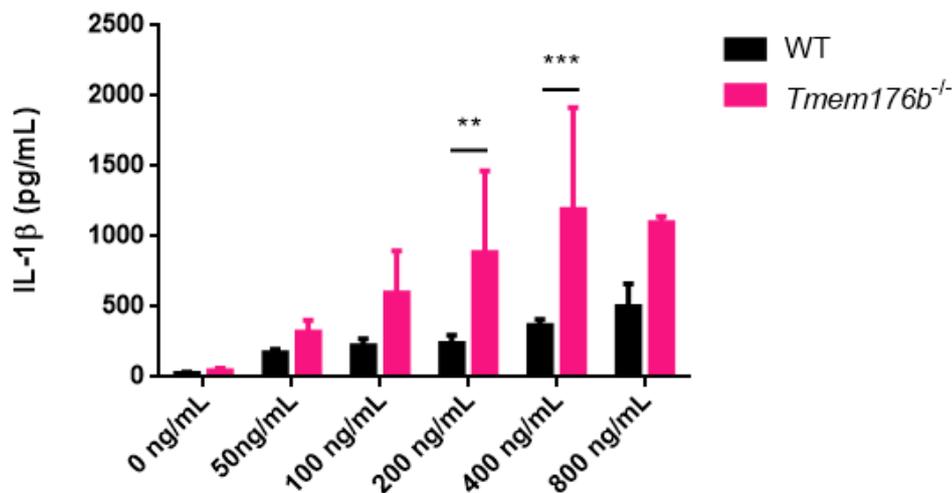


Figura 8. Producción de IL-1 β en BMDCs WT y *Tmem176b*^{-/-} estimuladas con LPS. BMDCs provenientes de ratones WT y *Tmem176b*^{-/-} se trataron durante 24hs con 0, 50, 100, 200, 400 u 800 ng/mL de LPS. Pasadas las 24hs se realizó un ELISA para evaluar la producción de IL-1 β en el sobrenadante de cultivo. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes. **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001, Two-Way ANOVA.

Estos resultados demuestran que en las BMDCs la deficiencia en *Tmem176b* es capaz de aumentar la producción de IL-1 β , al activar el inflamasoma NLRP3 *in vitro*. Lo dicho se encuentra en acuerdo con resultados obtenidos por nuestro laboratorio en experimentos *in vivo*, que evidencian que la deficiencia en *Tmem176b* se asocia a un aumento en la activación del inflamasoma NLRP3, lo cual ocasiona un incremento de la producción de IL-1 β y el consecuente reclutamiento de neutrófilos (Russo, 2015). De esta manera, se puede concluir que, al igual que como sucede *in vivo*, en las BMDCs *Tmem176b* es capaz de inhibir la activación del inflamasoma NLRP3, dando lugar a una producción disminuida de IL-1 β .

Un punto que cabe destacar respecto a los resultados obtenidos es que la activación del inflamasoma NLRP3 fue posible utilizando únicamente LPS, a

pesar de que, como fue explicado previamente, este inflamasoma requiere dos señales para dar lugar a la producción de IL-1 β (He et al., 2016). En este sentido, se ha demostrado que las DCs pueden secretar cantidades importantes de IL-1 β de forma dependiente del inflamasoma NLRP3 al ser estimuladas por ligandos de TLRs (receptores de tipo toll, del inglés, *Toll Like Receptors*), como lo es el LPS, sin requerir de la estimulación con un segundo activador. A diferencia de lo que sucede en otras células, como los macrófagos, en las DCs la activación con LPS es suficiente para inducir la activación de la caspasa-1 y dar lugar al procesamiento y liberación de IL-1 β e IL-18 (He et al., 2013). Esta capacidad de inducción podría explicarse por el hecho de que las DCs presentan una expresión aumentada de NLRP3 (Guarda et al., 2011), lo cual ocasionaría que la estimulación de TLRs con LPS sea suficiente para alcanzar el umbral de activación del inflamasoma (He et al., 2013).

*Expresión de IDO1 en BMDCs *Tmem176b*^{-/-} y WT*

Para intentar demostrar la hipótesis de que la regulación del inflamasoma dada por *Tmem176b* puede regular a su vez la expresión de IDO1, nos dispusimos a investigar si el aumento en la producción de IL-1 β en las BMDCs, dado por la deficiencia de *Tmem176b*, se correlacionaba con un aumento en la expresión de IDO1 en estas células.

Para esto, realizamos un Western Blot de lisados celulares de BMDCs *Tmem176b*^{-/-} y WT tratadas con concentraciones de LPS capaces de producir una diferencia significativa en la producción de IL-1 β entre ambos grupos de células. Debido a que este procedimiento no había sido previamente realizado

en nuestro laboratorio, fue necesario poner a punto el protocolo del Western Blot para la detección de IDO1 en lisados celulares. Para llevarlo a cabo, se realizaron en paralelo dos electroforesis desnaturalizantes de lisados de BMDCs *Tmem176b*^{-/-} y WT, se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa mediante electro-transferencia semi seca, y se bloquearon las membranas con TBS-Tween 0.1%-Leche 5%. Ambas membranas se incubaron toda la noche con 1µg/mL de un anticuerpo monoclonal de rata anti-IDO1 de ratón, y una vez pasado este tiempo se realizó la incubación de cada membrana con 1 µg/mL de un anticuerpo secundario anti-rata diferente: burro anti-rata conjugado a HRP o ratón anti-rata conjugado a biotina; a la membrana tratada con este último anticuerpo se le adicionó posteriormente 1µg/mL de estreptavidina conjugada a HRP. El Western Blot se reveló por quimioluminiscencia, probando diferentes tiempos de exposición hasta lograr que la banda correspondiente a IDO1 se observara de forma clara pero sin llegar a saturarse, y de forma tal que se obtuviera la menor cantidad de ruido posible.

Una vez realizado el revelado, observamos la banda correspondiente a IDO1 (45KDa) en la membrana incubada con el anticuerpo secundario de ratón anti-rata conjugado a biotina (Figura 9A), pero no en la que se incubó con el anticuerpo de burro anti-rata conjugado a HRP (Figura 9B). Cabe destacar que si bien al utilizarse el anticuerpo secundario ratón anti-rata conjugado a biotina observamos bandas inespecíficas de diversos pesos moleculares, ninguna de ellas se presentó cercana al peso molecular de IDO1, por lo cual determinamos este anticuerpo secundario como el óptimo para realizar los Western Blot anti-IDO-1.

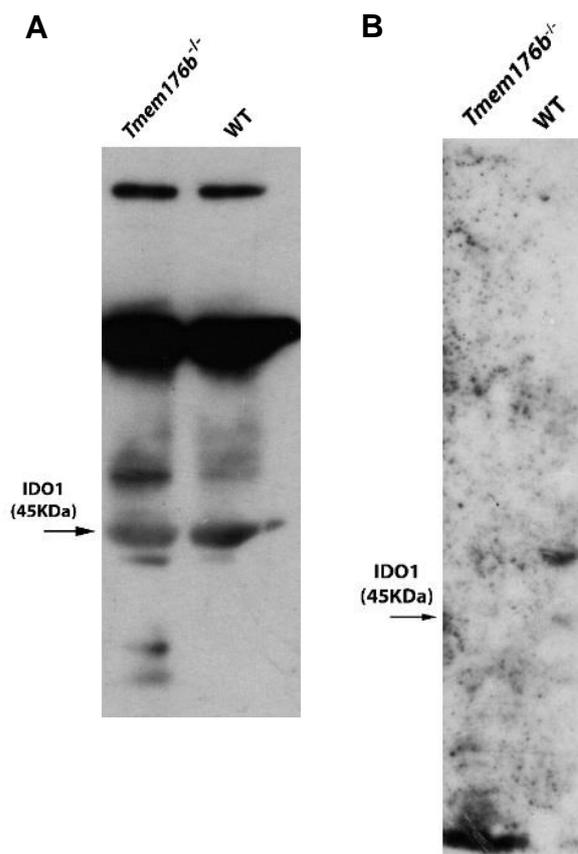


Figura 9. Puesta a punto del Western Blot anti-IDO1. Se realizó el Western Blot en lisados celulares de BMDCs de ratones *Tmem176b^{-/-}* y WT utilizando 1µg/mL de anticuerpo monoclonal de rata anti- IDO1 de ratón y diferentes anticuerpos secundarios: A) 1µg/mL de ratón anti-rata conjugado a biotina y 1µg/mL de estreptavidina conjugada a HRP. B) 1µg/mL de burro anti-rata conjugado a HRP. El revelado se realizó por quimioluminiscencia.

Una vez que determinamos el protocolo adecuado para la detección de IDO1 mediante Western Blot, se utilizó el mismo para analizar la expresión de esta enzima en BMDCs WT y *Tmem176b^{-/-}* tratadas con las concentraciones de LPS para las que se observó un aumento significativo en la producción de IL-1β por las BMDCs *Tmem176b^{-/-}*, respecto a las WT. Para esto, al día 8 de cultivo las BMDCs se trataron durante 24hs con 0, 200 y 400 ng/mL de LPS. Una vez pasado este tiempo, se obtuvo el lisado celular y se realizó el Western Blot anti-IDO1. Para determinar las diferencias en la expresión de IDO1 en las distintas muestras se cuantificaron las bandas obtenidas mediante el software ImageJ v.1.5i y se realizó la normalización respecto a la expresión de GAPDH.

Observamos una tendencia a la menor expresión de IDO1 en las BMDCs *Tmem176b*^{-/-}, en todos los tratamientos con LPS realizados (Figura 10A y 10B), aunque no se alcanzó la significancia estadística ($p > 0.05$, Two-Way ANOVA). Por otro lado, visualizamos, particularmente en las BMDCs *Tmem176b*^{-/-}, una disminución de la expresión de IDO1 de forma dependiente de la dosis de LPS (Figura 10B), sin embargo, esta tendencia tampoco resultó ser significativa ($p > 0.05$, Two-Way ANOVA).

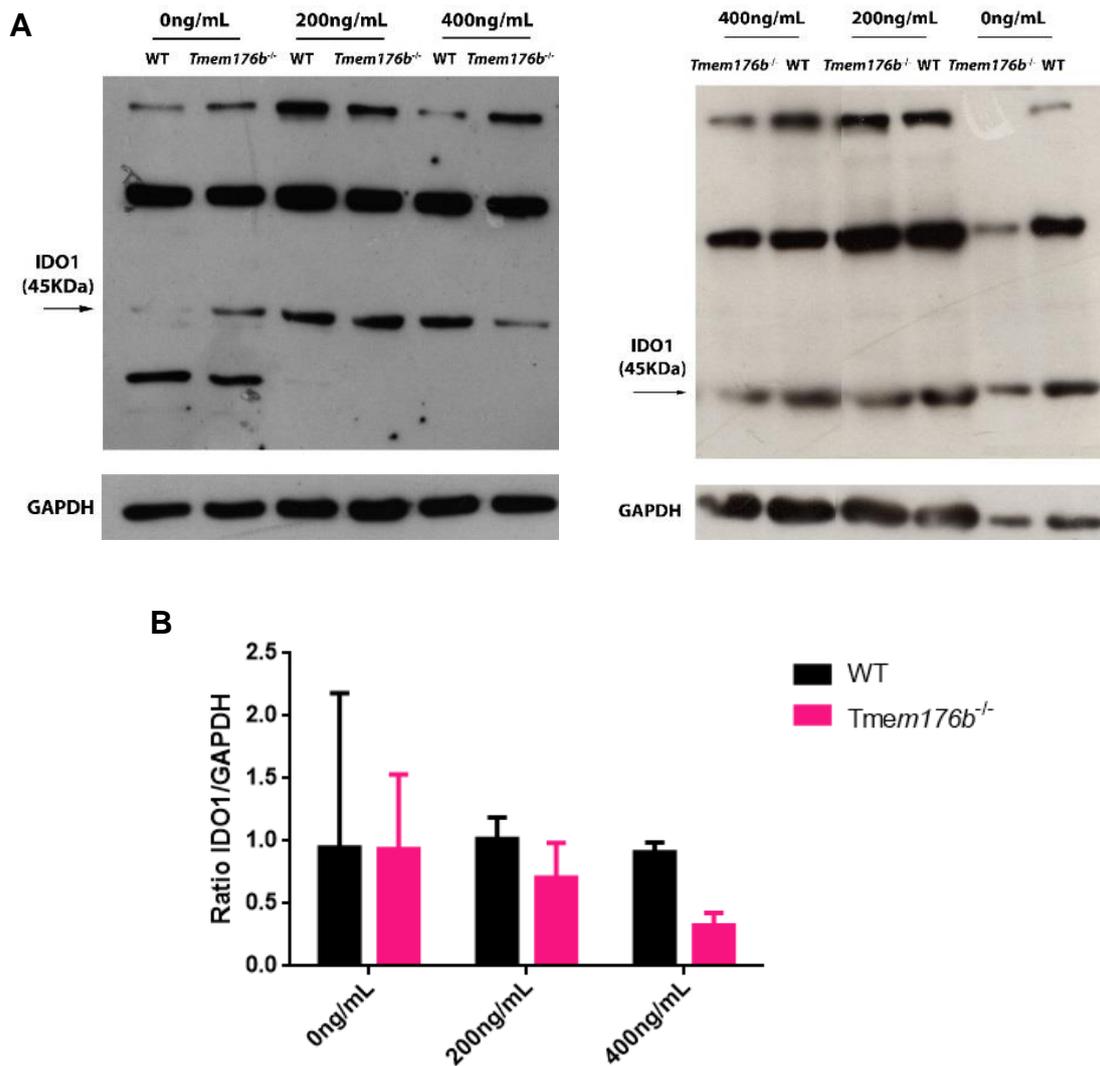


Figura 10. Expresión de IDO1 en BMDCs WT y *Tmem176b*^{-/-} estimuladas con LPS. A) Se realizó un Western Blot anti-IDO1 de lisados celulares de BMDCs *Tmem176b*^{-/-} y WT, estimuladas con 0, 200 o 400 ng/mL de LPS, utilizando el protocolo óptimo obtenido tras la puesta a punto. Se utilizó GAPDH como normalizador de la expresión de IDO1. Cada membrana corresponde a experimentos independientes. B) Expresión de IDO1 relativa a GAPDH de las muestras analizadas en A. La cuantificación de las bandas del Western Blot se realizó utilizando el software ImageJ v.1.5i. $p > 0.05$, Two-Way ANOVA.

Los resultados obtenidos hasta aquí sugieren que, en contraposición a nuestra hipótesis, en las BMDCs una mayor producción de IL-1 β no se correlacionaría a una mayor expresión de IDO1, sino que, por el contrario, existiría una tendencia a que concentraciones mayores de IL-1 β en el sobrenadante de cultivo de estas

células ocasionen una menor expresión de IDO1 en las mismas. Este resultado podría deberse a que en las BMDCs la expresión de IDO1 no sería regulada por la IL-1 β por los mismos mecanismos que describieron Hennequart y colaboradores para células tumorales. En dichas células, los autores observaron que la IL-1 β es capaz de inducir la expresión de COX-2 (ciclooxigenasa 2, del inglés, *Cyclooxygenase 2*) y mPGES1 (sintasa 1 de prostaglandina E microsomal, del inglés, *Microsomal Prostaglandin E Synthase 1*), dando lugar a un aumento en la síntesis de PGE2 (prostaglandina E 2, del inglés, *Prostaglandin E 2*), con la subsecuente producción aumentada de IDO1 (Hennequart et al., 2017). Existe evidencia de que la IL-1 β es capaz de inducir a COX-2 en varios tipos celulares, como líneas de células tumorales de cáncer de mama (Park y Kwon, 2011), células endoteliales, fibroblastos, monocitos, macrófagos (Herschman, 1996) y DCs (Obermajer et al., 2011), entre otros. Sin embargo, se ha reportado que si bien en DCs humanas la PGE2 es capaz de inducir fuertemente la expresión y actividad de IDO1 (Trabanelli et al., 2015), en BMDCs de ratón tratadas con LPS la PGE2 inhibe la expresión de esta enzima (Jung et al., 2010).

Estas evidencias podrían dar cuenta de la tendencia a la disminución en la expresión de IDO1 que observamos en las BMDCs, cuando existe una mayor concentración de IL-1 β en el sobrenadante de cultivo. De esta manera, la mayor producción de IL-1 β por las BMDCs *Tmem176b*^{-/-} podría inducir una mayor expresión de COX-2, y así dar lugar a una síntesis aumentada de PGE-2, la cual en estas células disminuiría la expresión de IDO1. Este mecanismo también explicaría la disminución de la expresión de IDO1 en las BMDCs de forma dosis

dependiente, ya que las altas concentraciones de LPS inducen una mayor secreción de IL-1 β , que en este contexto ocasionaría una disminución en aumento de la expresión de IDO1.

A modo de conclusión, Tmem176b, al reprimir la activación del inflamasoma NLRP3, podría favorecer la expresión de IDO1, ya que esta enzima sería inhibida por la presencia de IL-1 β . Esto parecería deberse a que dicha citoquina es capaz de inducir la expresión de PGE2, la cual tiene un rol regulatorio sobre la expresión de IDO1.

Estudio de la expresión y actividad de IDO1 en tumor y ganglio drenante de tumor de ratones *Tmem176b*^{-/-} y WT

*Expresión de IDO1 en tumor y ganglio drenante de tumor de ratones *Tmem176b*^{-/-} y WT*

Resultados de nuestro laboratorio han demostrado que la deficiencia en Tmem176b tiene una gran cantidad de efectos en el ambiente tumoral, que podrían no ser directamente mediados por la producción aumentada de IL-1 β , como por ejemplo la acumulación de células T reguladoras (Treg). Estas células se caracterizan por inducir la producción de IDO1 en DCs, a través de la interacción de CTLA-4 en las Treg con CD80 y/o CD86 en las DCs (Puccetti y Grohmann, 2007). Por este motivo, nos determinamos a investigar si la deficiencia en Tmem176b producía un aumento en la expresión de IDO1 a nivel

tumoral, donde podrían estar actuando mecanismos contra-reguladores desencadenados por la desinhibición del inflammasoma.

Con la finalidad de llevar a cabo este objetivo, analizamos mediante Western Blot la expresión de IDO1 en tumores EG7-OVA provenientes de ratones WT y *Tmem176b*^{-/-}. Para esto, se inyectaron ratones *Tmem176b*^{-/-} y WT con células EG7-OVA derivadas de linfoma tímico por vía subcutánea, y se dejaron desarrollar los tumores durante 14 días. Al día 14 se sacrificaron los ratones, se resecaron los tumores y se obtuvo un lisado tumoral. Con este lisado se realizó un Western Blot anti-IDO1, siguiendo el mismo procedimiento previamente descrito para las BMDCs. Para determinar los niveles de expresión de IDO1 se cuantificaron las bandas obtenidas utilizando el software ImageJ v. 1.5i y se realizó la normalización respecto a la expresión de GAPDH.

Observamos una tendencia a la menor expresión de IDO1 en los tumores de ratones *Tmem176b*^{-/-}, respecto a los de ratones WT, aunque esta diferencia no resultó ser significativa ($p=0.13$, test de Mann-Whitney) (Figura 11A y 11B).

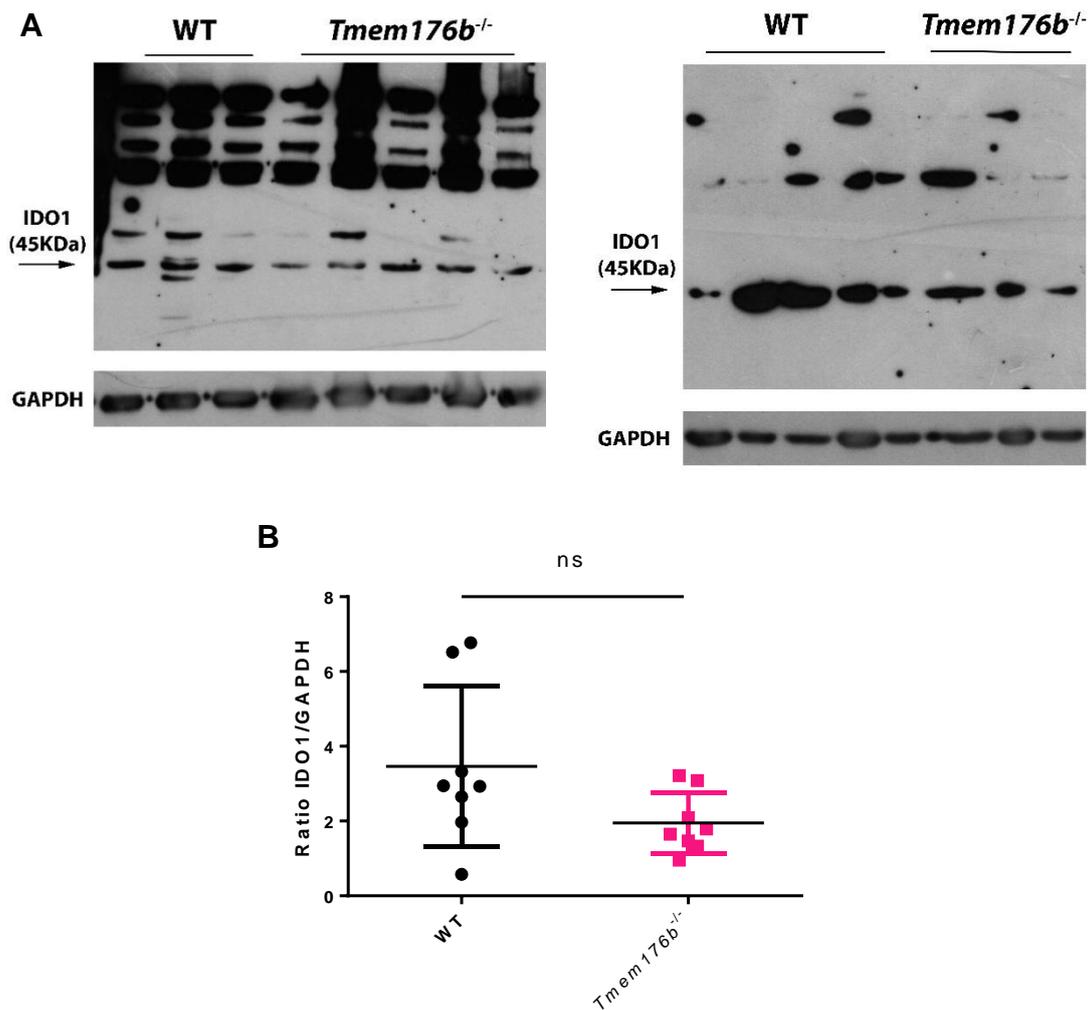


Figura 11. Expresión de IDO1 en tumores EG7-OVA de ratones WT y *Tmem176b*^{-/-} analizada mediante Western Blot. A) Se llevó a cabo un Western Blot anti-IDO1 de lisados tumorales de ratones WT y *Tmem176b*^{-/-} utilizando el protocolo óptimo obtenido tras la puesta a punto. Se utilizó GAPDH como normalizador de la expresión de IDO1. Cada membrana corresponde a experimentos independientes. B) Expresión de IDO1 relativa a GAPDH de las muestras analizadas en A. La cuantificación de las bandas del Western Blot se realizó utilizando el software ImageJ v. 1.5i. $p=0.13$, test de Mann-Whitney. ns, no significativo.

Teniendo en cuenta que parte fundamental de las respuestas inmunológicas ocurre en los ganglios linfáticos, y que resultados de nuestro laboratorio han demostrado que la deficiencia de *Tmem176b* tiene también efectos en el ganglio drenante del tumor (Russo, 2015), decidimos investigar si en este órgano existía una relación entre la expresión de *Tmem176b* e IDO1. Para esto, se reseco el

ganglio drenante del tumor de ratones *Tmem176b*^{-/-} y WT inyectados con células EG7-OVA, y se obtuvo un lisado del mismo. Al igual que para los tumores, se llevó a cabo un Western Blot anti-IDO1 con el protocolo descrito previamente. Para establecer posibles diferencias en la expresión de IDO1 se utilizó el software ImageJ v. 1.5i para cuantificar las bandas obtenidas y se normalizó la expresión de esta proteína respecto a GAPDH.

En los ganglios también encontramos una tendencia a la menor expresión de IDO1 en los ratones *Tmem176b*^{-/-} (Figura 12A y 12B), sin embargo, la diferencia observada no fue estadísticamente significativa (p=0.47, test de Mann-Whitney).

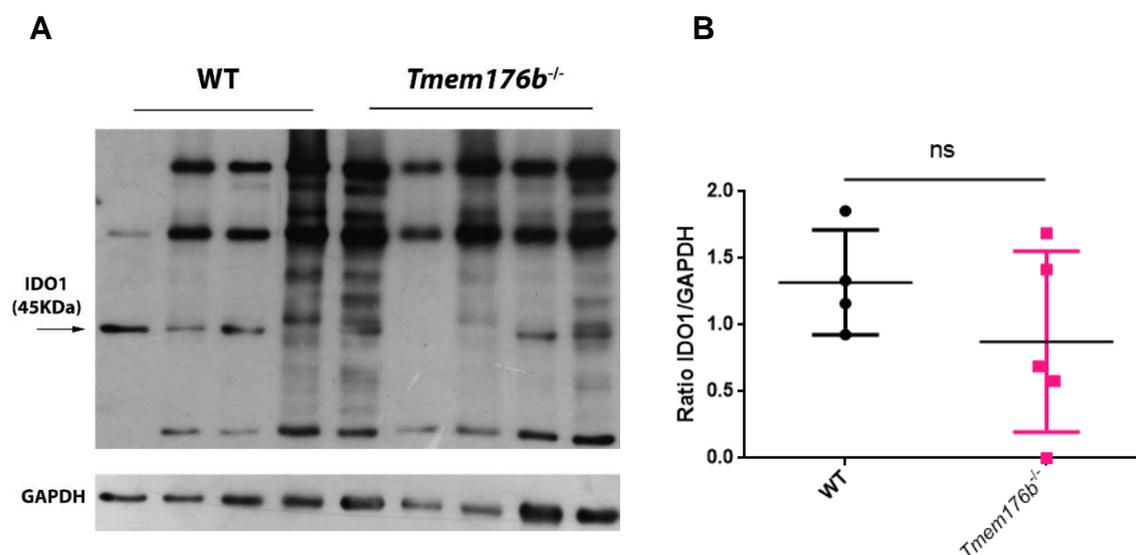


Figura 12. Expresión de IDO1 en ganglios drenantes de tumores EG7-OVA de ratones WT y *Tmem176b*^{-/-} analizada mediante Western Blot. A) Se realizó un Western Blot anti-IDO1 en lisados de ganglios drenantes de tumor de ratones WT y *Tmem176b*^{-/-} utilizando el protocolo óptimo obtenido tras la puesta a punto. Se utilizó GAPDH como normalizador de la expresión de IDO1. B) Expresión de IDO1 relativa a GAPDH en las muestras analizadas en A. La cuantificación de las bandas del Western Blot se realizó utilizando el software ImageJ v. 1.5i. p= 0.4127, test de Mann-Whitney. ns, no significativo

Dado que al analizar la expresión de IDO1 mediante Western Blot no obtuvimos resultados concluyentes en el tumor ni en el ganglio drenante, nos dispusimos a estudiar los niveles de expresión de Ido1 mediante RT-PCR cuantitativa. Para llevarlo a cabo, se extrajo el ARN de tumores EG7-OVA y de ganglios drenantes de tumor de ratones *Tmem176b^{-/-}* y WT mediante la técnica de Trizol-cloroformo. Posteriormente se retrotranscribieron 2µg de ARN utilizando OligodTs y se realizó la PCR cuantitativa de Ido1, usando Gapdh como gen normalizar.

En primer lugar, confirmamos la correcta amplificación de Ido1 y de Gapdh, corroborando además la falta de amplificación en los controles negativos (Figura 13A). Respecto a la expresión de Ido1, encontramos que la misma fue significativamente mayor en los tumores provenientes de ratones *Tmem176b^{-/-}*, en comparación con los tumores de ratones WT ($p= 0.0274$, test de Mann-Whitney) (Figura 13B). En el ganglio linfático drenante del tumor no detectamos una diferencia significativa en los niveles de expresión de Ido1 entre los ratones *Tmem176b^{-/-}* y WT ($p=0.83$, test de Mann-Whitney), aunque observamos una tendencia a la menor expresión en los ratones *Tmem176b^{-/-}* (Figura 13C).

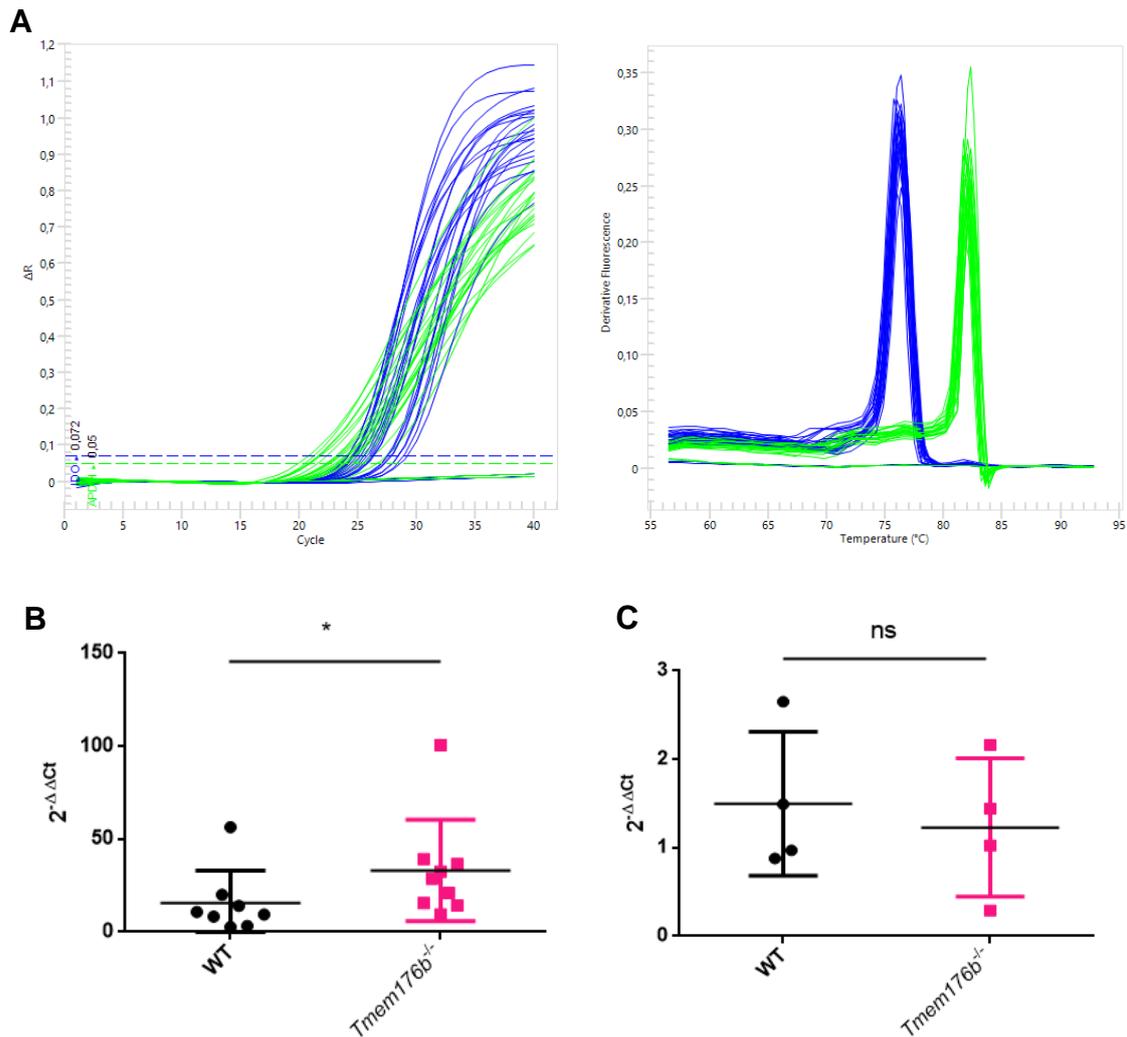


Figura 13. Expresión de Ido1 en tumores EG7-OVA y ganglios drenantes de tumor de ratones WT y *Tmem176b*^{-/-} analizada por RT-PCR cuantitativa. Se realizó una RT-PCR cuantitativa para estudiar la expresión de Ido1 en tumores y ganglios drenantes de tumor de ratones WT y *Tmem176b*^{-/-}. Se utilizó Gapdh como normalizador. A) Perfil de amplificación (izquierda) y curva de melting (derecha) para Ido1 (azul) y Gapdh (verde). B) Cuantificación relativa de la expresión de Ido1 respecto a Gapdh en los tumores, expresada como $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes. * $p=0.0274$, test de Mann-Whitney. C) Cuantificación relativa de la expresión de Ido1 respecto a Gapdh en los ganglios drenantes de tumor, expresada como $2^{-\Delta\Delta C_t}$. $p=0.83$, test de Mann-Whitney. ns, no significativo.

El hecho de que en el tumor la expresión de IDO1 a nivel proteico y a nivel del ARNm vaya en sentidos opuestos podría deberse a que, como se ha reportado ampliamente, no necesariamente existe una relación entre los niveles de

proteína y de ARNm para una molécula dada (Liu et al., 2016). Esto ocurre porque existen diversos fenómenos, más allá de la concentración del ARNm, que pueden contribuir al nivel de expresión de una proteína (McManus et al., 2015). Dentro de estos fenómenos se encuentran: 1) la tasa de traducción, la cual se encuentra fuertemente influenciada por la secuencia del ARNm (Wethmar et al., 2010); 2) la modulación de la tasa de traducción, que depende de la unión de proteínas a elementos reguladores en el ARNm (Barrett et al., 2012); 3) la regulación de la vida media de la proteína, la cual es afectada por la vía ubiquitina-proteosoma (Tang y Amon, 2013); 4) el retraso de la síntesis proteica, debido a que la síntesis posee cierta duración temporal, los cambios observados a nivel del ARNm pueden requerir un período de tiempo para reflejarse a nivel proteico (Liu et al., 2016).

*Producción de quinurenina a nivel tumoral en ratones *Tmem176b*^{-/-} y WT*

En vista de los resultados no concluyentes e inesperados obtenidos a nivel tumoral, decidimos investigar si existían diferencias en la actividad enzimática de IDO1 en los tumores, que fueran en el sentido de los resultados observados para la expresión de esta enzima a nivel proteico o del ARNm.

Para esto, se analizó la concentración de quinurenina en los tumores EG7-OVA de ratones *Tmem176b*^{-/-} y WT. Esta molécula corresponde a uno de los metabolitos generados tras la degradación del triptófano por la acción de IDO1, por lo cual una concentración aumentada de la misma se puede relacionar a una mayor actividad enzimática de IDO1. La determinación de la concentración de quinurenina se realizó en los lisados tumorales utilizando el método del reactivo

de Ehrlich, el cual consiste en la precipitación de proteínas con ácido tricloroacético 30%, y la posterior incubación de la fracción soluble con el reactivo de Ehrlich para evidenciar la presencia de quinurenina (Takikawa et al., 1988). Para poder llevar a cabo la cuantificación de la concentración de quinurenina, se realizó una curva de calibración con L-quinurenina comercial sometida al mismo procedimiento que las muestras tumorales.

Encontramos que los tumores provenientes de ratones *Tmem176b*^{-/-} presentaron una concentración significativamente mayor de quinurenina que los de ratones WT (p=0.0179, test de Mann-Whitney) (Figura 14). Esto puede tomarse como indicativo de una mayor actividad enzimática de IDO1 en los tumores deficientes en *Tmem176b*.

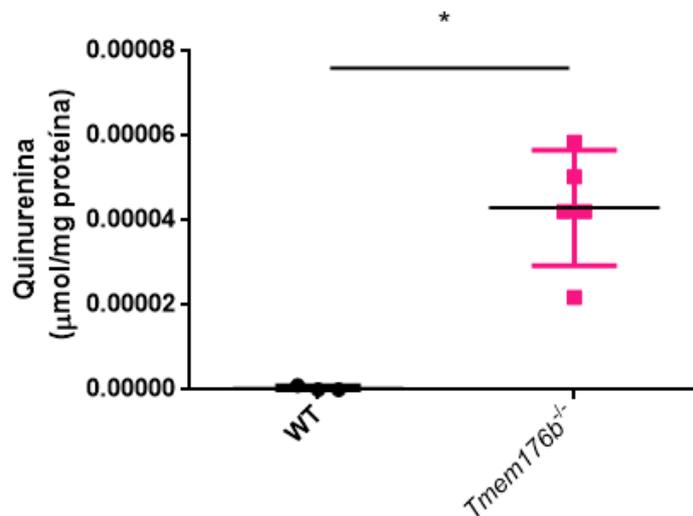


Figura 14. Presencia de quinurenina en tumores EG7-OVA de ratones WT y *Tmem176b*^{-/-}. Se realizó el análisis de la producción de quinurenina en lisados tumorales de ratones WT y *Tmem176b*^{-/-} utilizando el método del reactivo de Ehrlich.*p=0.0179, test de Mann-Whitney

Los resultados obtenidos apuntan a que en los tumores de los ratones *Tmem176b*^{-/-} existiría una mayor actividad enzimática de IDO1, evidenciada por la mayor producción de quinurenina en dichos tumores, lo cual iría en el sentido de los resultados obtenidos respecto a la expresión de IDO1 a nivel del ARNm.

El hecho de exista una diferencia significativa en la actividad enzimática de IDO1 entre los tumores de los ratones WT y *Tmem176b*^{-/-}, a pesar de no haber una disparidad que alcance la significancia estadística en la expresión de esta enzima a nivel proteico, podría deberse a la acción de la enzima hemoxigenasa-1 (HO-1). Nuestro equipo ha reportado que en el cáncer de mama, HO-1 es capaz de actuar sobre IDO1, inhibiendo su actividad enzimática a nivel post-traduccional (Hill et al., 2005). Esto sucede porque IDO1 presenta como único grupo prostético al grupo hemo (Shimizu et al., 1978), el cual es necesario para su actividad enzimática, y puede ser consumido por HO-1 (Sono et al., 1980; Thomas et al., 2001). En este sentido, sería posible que en los tumores de los ratones WT exista una expresión aumentada de HO-1, respecto a los tumores de los ratones *Tmem176b*^{-/-}, lo cual ocasionaría una inhibición de la actividad de IDO1 en los ratones WT, a pesar de no existir una expresión diferencial a nivel proteico de IDO1 que los ratones *Tmem176b*^{-/-}, pudiendo dar cuenta a los resultados obtenidos.

El hecho de que exista una expresión diferencial de IDO1 entre los ratones *Tmem176b*^{-/-} y WT a nivel tumoral pero no en el ganglio linfático drenante sugiere que, en nuestro modelo de estudio, la inducción de IDO1 ocurriría por mecanismos indirectos desencadenados por la IL-1 β , ya que resultados previos

de nuestro laboratorio han demostrado que la activación aumentada del inflammasoma se da a nivel del ganglio drenante, pero no a nivel tumoral (Segovia et al., 2019).

La diferencia en la expresión de IDO1 a nivel tumoral y no del ganglio linfático drenante del tumor lleva a pensar que la inducción de esta enzima, mediada por la ausencia de *Tmem176b*, podría tratarse de un mecanismo intrínseco al microambiente tumoral, siendo desencadenada por células o factores que se encuentren aumentados en el tumor de los ratones *Tmem176^{-/-}*. Una población celular candidata para dar cuenta a la expresión y actividad enzimática aumentada de IDO1 en los tumores de los ratones *Tmem176b^{-/-}* corresponde a las Treg, ya que estas células son capaces de inducir la expresión de dicha enzima en DCs (Puccetti y Grohmann, 2007), y hemos probado que las Treg FoxP3⁺ se encuentran aumentadas en los tumores de los ratones *Tmem176b^{-/-}* (Russo, 2015). Por otro lado, las células TCD8⁺ también podrían jugar un rol central en la inducción aumentada de IDO1 en los tumores de los ratones *Tmem176b^{-/-}*. Como se explicó anteriormente, las células TCD8⁺ tienen un papel fundamental en la inmunidad anti-tumoral, y una vez activadas y diferenciadas a CTLs son capaces de migrar desde el ganglio linfático al microambiente tumoral, donde ejercen su función efectora (Weninger, et al., 2002). En nuestro laboratorio, hemos demostrado que las células TCD8⁺ se encuentran aumentadas en los tumores de los ratones *Tmem176b^{-/-}* (Russo, 2015), y se ha reportado que las mismas son capaces de inducir la expresión de IDO1 y el reclutamiento de Treg en el microambiente tumoral (Spranger et al., 2013). Adicionalmente, se ha evidenciado que la IL-1 β es capaz de dar lugar a la

expansión, diferenciación, y migración de células TCD8⁺ hacia los tejidos periféricos (Ben-Sasson et al., 2013). Estas evidencias en conjunto apuntan a que las células TCD8⁺ podrían ser fundamentales a nivel mecánico para dar lugar a los resultados observados. De esta manera, la desinhibición del inflammasoma NLRP3 mediada por la ausencia de *Tmem176b*, con el consecuente aumento de la secreción de IL-1 β , daría lugar a una expansión y migración de células TCD8⁺ al microambiente tumoral. Estas células, una vez en el tumor, además de dar lugar a una respuesta anti-tumoral, que podría explicar la mayor supervivencia observada en los ratones *Tmem176b*^{-/-} portadores de tumores (Russo, 2015), inducirían la expresión de IDO1 y el reclutamiento de células Treg, las cuales a su vez serían capaces de aumentar aún más la expresión de esta enzima a nivel tumoral.

En lo que tiene que ver con el ganglio linfático drenante del tumor, resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que en los ratones *Tmem176b*^{-/-} existe una acumulación de células TH17 y un menor porcentaje de Treg, respecto a los ratones WT (Segovia et al., 2019). En este sentido, se ha reportado que IDO1, al actuar junto a señales derivadas de células T efectoras activadas como la IL-6, es capaz de regular la conversión de células Treg a TH17 en el ganglio drenante de tumor, siendo que la inhibición de IDO1 da lugar a la conversión de células Treg hacia un fenotipo efector de tipo TH17 (Sharma et al., 2009). Si bien en este trabajo no pudimos demostrar que en los ganglios drenantes de tumor de los ratones *Tmem176b*^{-/-} hubiera una disminución significativa en la expresión de IDO1, respecto a los ganglios de ratones WT, sí observamos una tendencia en este sentido. De esta manera si en futuros experimentos lográramos

demostrar que esta tendencia es significativa, podría plantearse un mecanismo en el cual la desinhibición del inflamasoma NLRP3, mediada por la deficiencia de Tmem176b, llevaría de alguna manera a una disminución de la expresión de IDO1 en los ganglios linfáticos drenantes del tumor. Esto ocasionaría la conversión de células Treg a células TH17, las cuales podrían ser importantes en la inmunidad anti-tumoral mediada por la desinhibición del inflamasoma.

Conclusiones y Perspectivas

En conclusión, los resultados del presente trabajo demuestran que, al menos a nivel tumoral, habría una relación entre Tmem176b e IDO1, en la cual la desinhibición del inflammasoma, mediada por la deficiencia de Tmem176b, sería capaz de inducir la expresión de IDO1. Esto evidencia la existencia de un mecanismo contra-regulador del sistema inmunológico, donde la sobre-activación del mismo, en este caso mediante la desinhibición del inflammasoma NLRP3 y la consecuente secreción aumentada de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β , es capaz de dar lugar a un fenómeno, la expresión de IDO1, capaz de disminuir la respuesta. Dicho mecanismo resalta el rol fundamental de la inmunoregulación, que ocasiona que a pesar de existir mecanismos sumamente eficientes para combatir una amenaza, en este caso el cáncer, estos siempre van a verse de alguna manera “opacados” por la inducción de diferentes procesos capaces de “frenar” la respuesta, y cuyo rol es finalmente generar un balance para mantener la homeostasis tisular, a expensas de permitir el progreso de la enfermedad.

Los resultados obtenidos dan lugar a la posibilidad de generar estrategias para favorecer las respuestas anti-tumorales, al menos en nuestro modelo de trabajo, donde hemos demostrado que la actividad aumentada del inflammasoma es capaz de controlar la progresión tumoral. En este sentido, lo evidenciado en este trabajo sugiere que estrategias que sean capaces de desinhibir el inflammasoma, por ejemplo utilizando un compuesto inhibidor de Tmem176b, con en lo cual hemos

tenido resultados prometedores en nuestro laboratorio (Segovia et al., 2019), se podrían combinar con inhibidores de IDO1, como el 1MT (1-metil triptófano), para mejorar la respuesta anti-tumoral. De esta manera, sería pertinente evaluar si la inhibición de IDO1 en ratones *Tmem176b*^{-/-} o tratados con el inhibidor de *Tmem176b*, es capaz de potenciar la respuesta anti-tumoral mediada por la desinhibición del inflamasoma.

En lo que tiene que ver con los mecanismos por los cuales la deficiencia en *Tmem176b* es capaz de favorecer la expresión de IDO1 en el microambiente tumoral, sería interesante analizar si el tratamiento con anticuerpos anti-CTLA-4 es capaz de dar lugar a una disminución de la expresión de IDO1 en los tumores de ratones *Tmem176b*^{-/-}, ya que como se mencionó previamente, la interacción de CTLA-4 en células Treg con CD80/CD86 en DCs es capaz de inducir la expresión de IDO1 en estas últimas (Puccetti y Grohmann, 2007). Resultados de nuestro laboratorio han demostrado que el tratamiento con anti-CTLA-4 actúa de forma sinérgica a la desinhibición del inflamasoma, y es posible que uno de los tantos mecanismos que dan lugar a este efecto tenga que ver con la eventual disminución de la expresión de IDO1. Adicionalmente, sería importante determinar si la expresión de IDO1 en los ratones *Tmem176b*^{-/-} se ve disminuida al depletar las células TCD8⁺, ya que es posible que estas sean un pilar fundamental para la inducción de IDO1 en el microambiente tumoral de estos ratones (Spranger et al., 2013).

Por otro lado, un objetivo principal de futuros proyectos es la identificación de las células que dan lugar a la producción de IDO1 en el microambiente tumoral, ya

que se ha demostrado que tanto las células tumorales como las infiltrantes son capaces de expresar esta enzima en dicho microambiente.

Finalmente, otro objetivo a desarrollar tiene que ver con intentar explicar el hecho de que la actividad enzimática de IDO1 se encuentre aumentada en los tumores de los ratones *Tmem176b*^{-/-}, a pesar de no haber una expresión diferencial de dicha enzima a nivel proteico, respecto a los ratones WT. En este sentido, sería importante analizar si existe una correlación entre la expresión de IDO1 y HO-1, así como realizar ensayos funcionales de inhibición de HO-1 *in vivo*, que puedan demostrar una posible inhibición de la actividad enzimática de IDO-1 en los ratones WT mediada por HO-1.

Bibliografía

- Abascal, W., Esteves, E., Goja, B., Mora, F. G., Lorenzo, A., Sica, A., Triunfo, P. y Harris, J. E. (2012). Tobacco control campaign in Uruguay: a population-based trend analysis. *The Lancet*, 380(9853), 1575-1582.
- Adams, J. M. y Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324-1337.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. y Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 3983-3988.
- Anandasabapathy, N., Feder, R., Mollah, S., Tse, S.-W., Longhi, M. P., y Mehandru, S., Matos, I., Cheong, C., Ruane, D., Brane, L., Teixeira, A., Dobrin, J., Mizenina, O., Park, C. G., Meredith, M., Clausen, B. E., Nussenzweig, M. C. y Steinman, R. M. (2014). Classical Flt3L-dependent dendritic cells control immunity to protein vaccine. *The Journal of Experimental Medicine*, 211(9), 1875-1891.
- Antonopoulos, C., El Sanadi, C., Kaiser, W. J., Mocarski, E. S. y Dubyak, G. R. (2013). Proapoptotic Chemotherapeutic Drugs Induce Noncanonical Processing and Release of IL-1 via Caspase-8 in Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 191(9), 4789-4803.
- Antonopoulos, C., Russo, H. M., El Sanadi, C., Martin, B. N., Li, X., Kaiser, W. J., Mocaeski, E. y Dubyak, G. R. (2015). Caspase-8 as an Effector and Regulator of NLRP3 Inflammasome Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 290(33), 20167-20184.

- Appay, V., Douek, D. C. y Price, D. A. (2008). CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nature Medicine*, 14(6), 623-628.
- Baeriswyl, V. y Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 19(5), 329-337.
- Balkwill, F., Charles, K. A. y Mantovani, A. (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*, 7(3), 211-217.
- Barrett, L. W., Fletcher, S. y Wilton, S. D. (2012). Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(21), 3613-3634.
- Ben-Sasson, S. Z., Hogg, A., Hu-Li, J., Wingfield, P., Chen, X., Crank, M., Caucheteux, S., Ratner-Hurevich, M., Berzofsky, J. A., Nir-Paz, R. y Paul, W. E. (2013). IL-1 enhances expansion, effector function, tissue localization, and memory response of antigen-specific CD8 T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(3), 491-502.
- Bertram, J. S. (2000). The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 21(6), 167-223.
- Bhatia, S., Edidin, M., Almo, S. C. y Nathenson, S. G. (2006). B7-1 and B7-2: Similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. *Immunology Letters*, 104(1-2), 70-75.
- Brandacher, G. (2006). Prognostic Value of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression in Colorectal Cancer: Effect on Tumor-Infiltrating T Cells. *Clinical Cancer Research*, 12(4), 1144-1151.

- Burkhardt, D. L. y Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews Cancer*, 8(9), 671-682.
- Burnet, F. M. (1971). Immunological surveillance in neoplasia. *Transplantation Reviews*, 7, 3-25.
- Cahill, D. P., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. y Lengauer, C. (1999). Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends in Cell Biology*, 9(12), 57-60.
- Carmeliet, P. (2005). VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. *Oncology*, 69(3), 4-10.
- Chambers, C. A. (2001). The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends in Immunology*, 22(4), 217-223.
- Cho, R. W. y Clarke, M. F. (2008). Recent advances in cancer stem cells. *Current Opinion in Genetics and Development*, 18(1), 48-53.
- Chon, S. Y., Hassanain, H. H. y Gupta, S. L. (1996). Cooperative role of interferon regulatory factor 1 and p91 (STAT1) response elements in interferon-gamma-inducible expression of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(29), 17247-17252.
- Cobbold, S. P., Adams, E., Farquhar, C. A., Nolan, K. F., Howie, D., Lui, K. O., Fairchild, P. J., Mellor, A. L., Ron, D. y Waldmann, H. (2009). Infectious tolerance via the consumption of essential amino acids and mTOR signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(29), 12055-12060.
- Coffelt, S. B., Lewis, C. E., Naldini, L., Brown, J. M., Ferrara, N. y De Palma, M. (2010). Elusive Identities and Overlapping Phenotypes of Proangiogenic

- Myeloid Cells in Tumors. *The American Journal of Pathology*, 176(4), 1564-1576.
- Condamine, T., Le Texier, L., Howie, D., Lavault, A., Hill, M., Halary, F., Cobbold, S., Waldmann, H., Cuturi, M. C. y Chiffolleau, E. (2010). Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 88(3), 507-515.
- Coussens, L. M., Zitvogel, L. y Palucka, A. K. (2013). Neutralizing Tumor-Promoting Chronic Inflammation: A Magic Bullet? *Science*, 339(6117), 286-291.
- Cuajungco, M. P., Podevin, W., Valluri, V. K., Bui, Q., Nguyen, V. H. y Taylor, K. (2012). Abnormal accumulation of human transmembrane (TMEM)-176A and 176B proteins is associated with cancer pathology. *Acta Histochemica*, 114(7), 705-712.
- Curran, M. A., Montalvo, W., Yagita, H. y Allison, J. P. (2010). PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(9), 4275-4280.
- Davies, M. A. y Samuels, Y. (2010). Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene*, 29(41), 5545-5555.
- Daye, D. y Wellen, K. E. (2012). Metabolic reprogramming in cancer: Unraveling the role of glutamine in tumorigenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 23(4), 362-369.

- De Palma, M., Murdoch, C., Venneri, M. A., Naldini, L. y Lewis, C. E. (2007). Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications. *Trends in Immunology*, 28(12), 519-524.
- DeNardo, D. G., Andreu, P. y Coussens, L. M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(2), 309-316.
- Deshpande, A., Sicinski, P. y Hinds, P. W. (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene*, 24(17), 2909-2915.
- Dhup, S., Dadhich, R. K., Porporato, P. E. y Sonveaux, P. (2012). Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Current Pharmaceutical Design*, 18(10), 1319-1330.
- Dowling, J. K. y O'Neill, L. A. J. (2012). Biochemical regulation of the inflammasome. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 47(5), 424-443.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. y Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3(11), 991-998.
- Dunn, G. P., Old, L. J. y Schreiber, R. D. (2004a). The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annual Review of Immunology*, 22(1), 329-360.
- Dunn, G. P., Old, L. J. y Schreiber, R. D. (2004b). The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity*, 21(2), 137-148.
- Dupaul-Chicoine, J., Arabzadeh, A., Dagenais, M., Douglas, T., Champagne, C., Morizot, A., Rodrigue-Gervai, I., Breton, V., Colpitts, S. L., Beauchemin,

- N. y Saleh, M. (2015). The Nlrp3 Inflammasome Suppresses Colorectal Cancer Metastatic Growth in the Liver by Promoting Natural Killer Cell Tumoricidal Activity. *Immunity*, 43(4), 751-763.
- Egeblad, M., Nakasone, E. S. y Werb, Z. (2010). Tumors as Organs: Complex Tissues that Interface with the Entire Organism. *Developmental Cell*, 18(6), 884-901.
- Ehrlich, P. (1956). *Collected Papers of Paul Ehrlich* (Vols. 1–4). Londres, Inglaterra: Pergamon Press.
- Evan, G. y Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science*, 281(5381), 1317-1322.
- Ferrara, N. (2009). Vascular Endothelial Growth Factor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(6), 789-791.
- Flier, J. S., Underhill, L. H. y Dvorak, H. F. (1986). Tumors: Wounds That Do Not Heal. *New England Journal of Medicine*, 315(26), 1650-1659.
- Franchi, L., Eigenbrod, T., Muñoz-Planillo, R., Ozkurede, U., Kim, Y. G., Chakrabarti, A., Gale, M., Silverman, R., Colonna, M., Akira, S. y Núñez, G. (2014). Cytosolic Double-Stranded RNA Activates the NLRP3 Inflammasome via MAVS-Induced Membrane Permeabilization and K⁺ Efflux. *The Journal of Immunology*, 193(8), 4214-4222.
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R. y Honjo, T. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative

- regulation of lymphocyte activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(7), 1027-1034.
- Gabhann, F. M. y Popel, A. S. (2008). Systems Biology of Vascular Endothelial Growth Factors. *Microcirculation*, 15(8), 715-738.
- Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K., Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E., Perfettini, J. L., Schlemmer, F., Tadmimir, E., Uhl, M., Génin, P., Civas, A., Ryffel, B., Kanellopoulos, J., Tschopp, J., André, F., Lidereau, R., McLaughlin, N. M., Haynes, N. M., Smyth, M. J., Kroemer, G. y Zitvogel, L. (2009). Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. *Nature Medicine*, 15(10), 1170-1178.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R. y Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, 140(6), 883-899.
- Gros, A., Robbins, P. F., Yao, X., Li, Y. F., Turcotte, S., Tran, E., Wunderlich, J. R., Mixon, A., Farid, S., Dudley, M. E., Hanada, K., Almeida, J. R., Darko, S., Douek, D. C., Yang, J. C. y Rosenberg, S. A. (2014). PD-1 identifies the patient-specific CD8⁺ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *Journal of Clinical Investigation*, 124(5), 2246-2259.
- Guarda, G., Zenger, M., Yazdi, A. S., Schroder, K., Ferrero, I., Menu, P., Tardivel, A., Mattman, C. y Tschopp, J. (2011). Differential Expression of NLRP3 among Hematopoietic Cells. *The Journal of Immunology*, 186(4), 2529-2534.
- Gubin, M. M., Zhang, X., Schuster, H., Caron, E., Ward, J. P., Noguchi, T., Ivanova, Y., Hundal, J., Arthur, C. D., Krebber, W. J., Mulder, G. E.,

- Toebe, M., Vesely, M. D., Lam, S. S., Korman, A. J., Allison, J. P., Freeman, G. J., Sharpe, A. H., Pearce, E. L., Schumacher, T. N., Aebbersold, R., Rammensee, H. G., Melief, C. J., Mardis, E. R., Gillanders, W. E., Artyomov, M. N. y Schreiber, R. D. (2014). Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature*, 515(7528), 577-581.
- Gurung, P., Anand, P. K., Malireddi, R. K. S., Vande Walle, L., Van Opdenbosch, N., Dillon, C. P., Weinlich, R., Green, D. R., Lamkanfi, M. y Kanneganti, T. D. (2014). FADD and Caspase-8 Mediate Priming and Activation of the Canonical and Noncanonical Nlrp3 Inflammasomes. *The Journal of Immunology*, 192(4), 1835-1846.
- Han, J., Bae, S. Y., Oh, S. J., Lee, J., Lee, J. H., Lee, H., Lee, S. K., Kil, W. H., Nam, S. J., Kim, S. y Lee, J. E. (2014). Zerumbone Suppresses IL-1 β -induced Cell Migration and Invasion by Inhibiting IL-8 and MMP-3 Expression in Human Triple-negative Breast Cancer Cells: The Effect of Zerumbone on IL-1 β -induced Cell Motility. *Phytotherapy Research*, 28(11), 1654-1660.
- Hanahan, D. y Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353-364.
- Hanahan, D. y Coussens, L. M. (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309-322.
- Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.

- Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2016). Biological hallmarks of cancer. En R. C. Bast, W. N. Hait, D. W. Kufe, R. R. Weichselbaum, J. F. Holland, C. M. Croce, M. Piccart-Gebart, H. Wang, W. K. Hong y R. E. Pollock (Eds.), *Holland-Frei Cancer Medicine*. Nueva Jersey, Estados Unidos: John Wiley and Sons, Inc.
- He, Q., Fu, Y., Tian, D. y Yan, W. (2018). The contrasting roles of inflammasomes in cancer. *American Journal of Cancer Research*, 8(4), 566–583.
- He, Y., Franchi, L. y Nuñez, G. (2013). TLR Agonists Stimulate Nlrp3-Dependent IL-1 Production Independently of the Purinergic P2X7 Receptor in Dendritic Cells and In Vivo. *The Journal of Immunology*, 190(1), 334-339.
- He, Y., Hara, H. y Nuñez, G. (2016). Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(12), 1012-1021.
- Hellmann, M. D., Rizvi, N. A., Goldman, J. W., Gettinger, S. N., Borghaei, H., Brahmer, J. R., Ready, N. E., Gerber, D. E., Chow, L. Q., Juergens, R. A., Shepherd, F. A., Laurie, S. A., Geese, W. J., Agrawal, S., Young, T. C., Li, X. y Antonia, S. J. (2017). Nivolumab plus ipilimumab as first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer (CheckMate 012): results of an open-label, phase 1, multicohort study. *The Lancet Oncology*, 18(1), 31-41.
- Hennequart, M., Pilotte, L., Cane, S., Hoffmann, D., Stroobant, V., Plaen, E. D. y Eynde, B. J. V. (2017). Constitutive IDO1 Expression in Human Tumors Is

- Driven by Cyclooxygenase-2 and Mediates Intrinsic Immune Resistance. *Cancer Immunology Research*, 5(8), 695-709.
- Herschman, H. R. (1996). Prostaglandin synthase 2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1299(1), 125-140.
- Higuchi, K. y Hayaishi, O. (1967). Enzymic formation of d-kynurenine from d-tryptophan. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 120(2), 397-403.
- Hill, M. (2006). *Contribution à la caractérisation de l'indoleamine 2,3-dioxygénase* (Tesis de Doctorado). École doctorale chimie biologie, Université de Nantes, Francia.
- Hill, M., Pereira, V., Chauveau, C., Zagani, R., Remy, S., Tesson, L., Mazal, D., Ubillos, L., Brion, R., Asghar, K., Mashreghi, M. F., Kotsch, K., Moffett, J., Doebis, C., Seifert, M., Boczkowski, J., Osinaga, E. y Anegon, I. (2005). Heme oxygenase-1 inhibits rat and human breast cancer cell proliferation: mutual cross inhibition with indoleamine 2,3-dioxygenase. *The FASEB Journal*, 19(14), 1957-1968.
- Hill, M., Tanguy-Royer, S., Royer, P., Chauveau, C., Asghar, K., Tesson, L., Lavainne, F., Rémy, S., Brion, R., Hubert, F. X., Heslan, M., Rimbart, M., Berthelot, L., Moffett, J. R., Josien, R., Grégoire, M. y Anegon, I. (2007). IDO expands human CD4+CD25high regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 37(11), 3054-3062.
- Hill, R. P. (1990). Tumor progression: Potential role of unstable genomic changes. *Cancer and Metastasis Reviews*, 9(2), 137-147.

- Holmgaard, R. B., Zamarin, D., Munn, D. H., Wolchok, J. D. y Allison, J. P. (2013). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(7), 1389-1402.
- Hwu, P., Du, M. X., Lapointe, R., Do, M., Taylor, M. W. y Young, H. A. (2000). Indoleamine 2,3-Dioxygenase Production by Human Dendritic Cells Results in the Inhibition of T Cell Proliferation. *The Journal of Immunology*, 164(7), 3596-3599.
- Inaba, T., Ino, K., Kajiyama, H., Yamamoto, E., Shibata, K., Nawa, A., Nagasaka, T., Akimoto, H., Takikawa, O. y Kikkawa, F. (2009). Role of the immunosuppressive enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase in the progression of ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 115(2), 185-192.
- Ino, K., Yamamoto, E., Shibata, K., Kajiyama, H., Yoshida, N., Terauchi, M., Nawa, A., Nagasaka, T., Takikawa, O. y Kikkawa, F. (2008). Inverse Correlation between Tumoral Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression and Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Endometrial Cancer: Its Association with Disease Progression and Survival. *Clinical Cancer Research*, 14(8), 2310-2317.
- Johansson, M., DeNardo, D. G. y Coussens, L. M. (2008). Polarized immune responses differentially regulate cancer development. *Immunological Reviews*, 222(1), 145-154.
- Joyce, J. A. y Pollard, J. W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 9(4), 239-252.

- Jung, I. D., Jeong, Y. I., Lee, C. M., Noh, K. T., Jeong, S. K., Chun, S. H., Choi, O. H., Park, W. S., Han, J., Shin, Y. K., Kim, H. W., Yun, C. H. y Park, Y. M. (2010). COX-2 and PGE2 signaling is essential for the regulation of IDO expression by curcumin in murine bone marrow-derived dendritic cells. *International Immunopharmacology*, 10(7), 760-768.
- Jung, I. D., Lee, C. M., Jeong, Y. I., Lee, J. S., Park, W. S., Han, J. y Park, Y. M. (2007). Differential regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide and interferon gamma in murine bone marrow derived dendritic cells. *FEBS Letters*, 581(7), 1449-1456.
- Kantono, M. y Guo, B. (2017). Inflammasomes and Cancer: The Dynamic Role of the Inflammasome in Tumor Development. *Frontiers in Immunology*, 8(1132).
- Kayagaki, N., Stowe, I. B., Lee, B. L., O'Rourke, K., Anderson, K., Warming, S., Cuellar, T., Haley, B., Roose-Girma, M., Phung, Q. T., Liu, P. S., Lill, J. R., Li, H., Wu, J., Kummerfeld, S., Zhang, J., Lee, W. P., Snipas, S. J., Salvesen, G. S., Morris, L. X., Fitzgerald, L., Zhang, Y., Bertram, E. M., Goodnow, C. C. y Dixit, V. M. (2015). Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*, 526(7575), 666-671.
- Koblish, H. K., Hansbury, M. J., Bowman, K. J., Yang, G., Neilan, C. L., Haley, P. J., Burn, T. C., Waeltz, P., Sparks, R. B., Yue, E. W., Combs, A. P., Scherle, P. A., Vaddi, K. y Fridman, J. S. (2010). Hydroxyamidine Inhibitors of Indoleamine-2,3-dioxygenase Potently Suppress Systemic Tryptophan Catabolism and the Growth of IDO-Expressing Tumors. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(2), 489-498.

- Konan, K. V. y Taylor, M. W. (1996). Importance of the Two Interferon-stimulated Response Element (ISRE) Sequences in the Regulation of the Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase Gene. *Journal of Biological Chemistry*, 271(32), 19140-19145.
- Kong, H., Wang, Y., Zeng, X., Wang, Z., Wang, H. y Xie, W. (2015). Differential expression of inflammasomes in lung cancer cell lines and tissues. *Tumor Biology*, 36(10), 7501-7513.
- Krummel, M. F. y Allison, J. P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *The Journal of Experimental Medicine*, 182(2), 459-465.
- Leach, D. R., Krummel, M. F. y Allison, J. P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, 271(5256), 1734-1736.
- Li, Y., Zhao, W., Zhao, Z., Wu, J., Chen, L., Ma, Y., Li, Q., Lu, D., Jin, L. y Wang, J. (2015). IL1 β gene polymorphisms, age and the risk of non-small cell lung cancer in a Chinese population. *Lung Cancer*, 89(3), 232-237.
- Linnemann, C., Van Buuren, M. M., Bies, L., Verdegaal, E. M. E., Schotte, R., Calis, J. J. A., Behjati, S., Velds, A., Hilkmann, H., Atmioui, D., Visser, M., Stratton, M. R., Haanen, J. B., Spits, H., Van der Burg, S. y Schumacher, T. N. M. (2015). High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4⁺ T cells in human melanoma. *Nature Medicine*, 21(1), 81-85.
- Liu, X., Hu, J., Sun, S., Li, F., Cao, W., Wang, Y., Ma, Z. y Yu, Z. (2015). Mesenchymal stem cells expressing interleukin-18 suppress breast

- cancer cells in vitro. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 9(4), 1192-1200.
- Liu, Y., Beyer, A. y Aebersold, R. (2016). On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell*, 165(3), 535-550.
- Lobo, N. A., Shimon, Y., Qian, D. y Clarke, M. F. (2007). The Biology of Cancer Stem Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23(1), 675-699.
- Louvet, C., Chiffolleau, E., Heslan, M., Tesson, L., Heslan, J. M., Brion, R., Beriou, G., Guillonnet, C., Khalife, J., Anegon, I. y Cuturi, M. C. (2005). Identification of a New Member of the CD20/FcepsilonRIbeta Family Overexpressed in Tolerated Allografts. *American Journal of Transplantation*, 5(9), 2143-2153.
- Lowe, S. W., Cepero, E. y Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 432(7015), 307-315.
- Lutz, M. B., Suri, R. M., Niimi, M., Ogilvie, A. L. J., Kukutsch, N. A., Röβner, S., Schuler, G. y Austyn, J. M. (2000). Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *European Journal of Immunology*, 30(7), 1813-1822.
- Mantovani, A. (2010). Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Current Molecular Medicine*, 10(4), 369-373.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. y Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), 436-444.

- Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W. P., Weinrauch, Y., Monack, D. M. y Dixit, V. M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, 440(7081), 228-232.
- McGaha, T. L., Huang, L., Lemos, H., Metz, R., Mautino, M., Prendergast, G. C. y Mellor, A. L. (2012). Amino acid catabolism: a pivotal regulator of innate and adaptive immunity. *Immunological Reviews*, 249(1), 135-157.
- McManus, J., Cheng, Z. y Vogel, C. (2015). Next-generation analysis of gene expression regulation – comparing the roles of synthesis and degradation. *Molecular BioSystems*, 11(10), 2680-2689.
- Munn, D. H., Zhou, M., Attwood, J. T., Bondarev, I., Conway, S. J., Marshall, B., Brown, C. y Mellor, A. L. (1998). Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*, 281(5380), 1191-1193.
- Munn, David H., Sharma, M. D., Baban, B., Harding, H. P., Zhang, Y., Ron, D. y Mellor, A. L. (2005). GCN2 Kinase in T Cells Mediates Proliferative Arrest and Anergy Induction in Response to Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Immunity*, 22(5), 633-642.
- Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S. B. y Lewis, C. E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 8(8), 618-631.
- Obermajer, N., Muthuswamy, R., Lesnock, J., Edwards, R. P. y Kalinski, P. (2011). Positive feedback between PGE2 and COX2 redirects the differentiation of human dendritic cells toward stable myeloid-derived suppressor cells. *Blood*, 118(20), 5498-5505.

- Otsubo, T., Hida, Y., Ohga, N., Sato, H., Kai, T., Matsuki, Y., Takasu, H., Akiyama, K., Maishi, N., Kawamoto, T., Shinohara, N., Nonomura, K. y Hida, K. (2014). Identification of novel targets for antiangiogenic therapy by comparing the gene expressions of tumor and normal endothelial cells. *Cancer Science*, 105(5), 560-567.
- Palucka, A. K. y Coussens, L. M. (2016). The Basis of Oncoimmunology. *Cell*, 164(6), 1233-1247.
- Park, E. J. y Kwon, T. K. (2011). Rottlerin enhances IL-1 β -induced COX-2 expression through sustained p38 MAPK activation in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Experimental and Molecular Medicine*, 43(12), 669-675.
- Platten, M., Von Knebel Doeberitz, N., Oezen, I., Wick, W. y Ochs, K., (2015) Cancer immunotherapy by targeting IDO1/TDO and their downstream effectors. *Frontiers in Immunology*, 5 (673), 1-7.
- Puccetti, P. y Grohmann, U. (2007). IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF- κ B activation. *Nature Reviews Immunology*, 7(10), 817-823.
- Qian, B. Z. y Pollard, J. W. (2010). Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell*, 141(1), 39-51.
- Ruffell, B., Chang-Strachan, D., Chan, V., Rosenbusch, A., Ho, C. M. T., Pryer, N., Daniel, D., Hwang, E. S., Rugo, H. S. y Coussens, L. M. (2014). Macrophage IL-10 Blocks CD8⁺ T Cell-Dependent Responses to Chemotherapy by Suppressing IL-12 Expression in Intratumoral Dendritic Cells. *Cancer Cell*, 26(5), 623-637.

- Russo, S. (2015). *Caracterización de nuevos blancos moleculares para modular la respuesta inmune anti-tumoral* (Tesis de Maestría). PEDECIBA, Universidad de la República, Uruguay.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. y Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology*, *155*(3), 1151-1164.
- Sansom, D. M., Manzotti, C. N. y Zheng, Y. (2003). What's the difference between CD80 and CD86? *Trends in Immunology*, *24*(6), 313-318.
- Schäfer, M. y Werner, S. (2008). Cancer as an overheating wound: an old hypothesis revisited. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(8), 628-638.
- Schroder, K. y Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. *Cell*, *140*(6), 821-832.
- Segovia, M., Louvet, C., Charnet, P., Savina, A., Tilly, G., Gautreau, L., Carretero- Iglesia, L., Beriou, G., Cerbian, I., Cens, T., Hepburn, L., Chiffolleau, E., Floto, R. A., Anegon, I., Amigorena, S., Hill, M. y Cuturi, M. C. (2014). Autologous Dendritic Cells Prolong Allograft Survival Through *Tmem176b* -Dependent Antigen Cross-Presentation: Immunoregulatory Mechanisms of Autologous DCs. *American Journal of Transplantation*, *14*(5), 1021-1031.
- Segovia, M., Russo, S., Jeldres, M., Mahmoud, Y., Perez, V., Duhalde, M., Charnet, P., Rousset, M., Louvet, C., Vanhove, B., Floto, R. A., Anegon, I., Rabinovich, G., Girotti, M. R., Cuturi, M. C. y Hill, M. (2019).

- Inflammasome disinhibition reinforces antitumor immunity and augments the efficacy of immune checkpoint blockers. *Cancer Cell*, en revisión.
- Segovia, M., Cuturi, M. C. y Hill, M. (2010). Preparation of Mouse Bone Marrow-Derived Dendritic Cells with Immunoregulatory Properties. En M. C. Cuturi e I. Anegón (Eds.), *Suppression and Regulation of Immune Responses*. Nueva Jersey, Estados Unidos: Humana Press.
- Sha, W., Mitoma, H., Hanabuchi, S., Bao, M., Weng, L., Sugimoto, N., Zhang, Z., Zhong, J., Sun, B. y Liu, Y. J. (2014). Human NLRP3 inflammasome senses multiple types of bacterial RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(45), 16059-16064.
- Sharma, M. D., Hou, D. Y., Liu, Y., Koni, P. A., Metz, R., Chandler, P., Mellor, A. L., He, Y. y Munn, D. H. (2009). Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. *Blood*, 113(24), 6102-6111.
- Sharma, P. y Allison, J. P. (2015). Immune Checkpoint Targeting in Cancer Therapy: Toward Combination Strategies with Curative Potential. *Cell*, 161(2), 205-214.
- Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J. A. y Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*, 168(4), 707-723.
- Sherr, C. J. y McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, 2(2), 103-112.

- Shimizu, T., Nomiya, S., Hirata, F. y Hayaishi, O. (1978). Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(13), 4700-4706.
- Sono, M., Taniguchi, T., Watanabe, Y. y Hayaishi, O. (1980). Indoleamine 2,3-dioxygenase. Equilibrium studies of the tryptophan binding to the ferric, ferrous, and CO-bound enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(4), 1339-1345.
- Soria, G., Ofri-Shahak, M., Haas, I., Yaal-Hahoshen, N., Leider-Trejo, L., Leibovich-Rivkin, T., Weitzenfeld, P., Meshel, T., Shabtai, E., Gutman, M. y Ben-Baruch, A. (2011). Inflammatory mediators in breast cancer: Coordinated expression of TNF α and IL-1 β with CCL2 and CCL5 and effects on epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*, 11(1), 130.
- Sorrentino, R., Terlizzi, M., Di Crescenzo, V. G., Popolo, A., Pecoraro, M., Perillo, G., Galderisi, A. y Pinto, A. (2015). Human Lung Cancer-Derived Immunosuppressive Plasmacytoid Dendritic Cells Release IL-1 α in an AIM2 Inflammasome-Dependent Manner. *The American Journal of Pathology*, 185(11), 3115-3124.
- Spranger, S., Spaapen, R. M., Zha, Y., Williams, J., Meng, Y., Ha, T. T. y Gajewski, T. F. (2013). Up-Regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the Melanoma Tumor Microenvironment Is Driven by CD8 $^+$ T Cells. *Science Translational Medicine*, 5(200), 200ra116.
- Steinman, R. M. (2012). Decisions About Dendritic Cells: Past, Present, and Future. *Annual Review of Immunology*, 30(1), 1-22.

- Stewart, B. W. y Wild, C. P. (2014). *World cancer report 2014*. Lyon, Francia. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization.
- Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E. y Flavell, R. (2012). Inflammasomes in health and disease. *Nature*, *481*(7381), 278-286.
- Sun, S., Liu, X., Jiang, D., Lü, Z. y Li, F. (2014). Effect of interleukin-18 gene modified human umbilical cord mesenchymal stem cells on proliferation of breast cancer cell. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, *94*(26), 2013-2017.
- Takikawa, O., Kuroiwa, T., Yamazaki, F. y Kido, R. (1988). Mechanism of interferon-gamma action. Characterization of indoleamine 2,3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon-gamma and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity. *The Journal of Biological Chemistry*, *263*(4), 2041-2048.
- Tang, Y. C. y Amon, A. (2013). Gene Copy-Number Alterations: A Cost-Benefit Analysis. *Cell*, *152*(3), 394-405.
- Terness, P., Bauer, T. M., Röse, L., Dufter, C., Watzlik, A., Simon, H. y Opelz, G. (2002). Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *The Journal of Experimental Medicine*, *196*(4), 447-457.
- Theate, I., Van Baren, N., Pilotte, L., Moulin, P., Larrieu, P., Renauld, J. C., Herve, C., Gutierrez-Roelens, I., Marbaix, E., Sempoux, C. y Van den Eynde, B. J. (2015). Extensive Profiling of the Expression of the Indoleamine 2,3-

- Dioxygenase 1 Protein in Normal and Tumoral Human Tissues. *Cancer Immunology Research*, 3(2), 161-172.
- Thomas, S. R., Salahifar, H., Mashima, R., Hunt, N. H., Richardson, D. R. y Stocker, R. (2001). Antioxidants inhibit indoleamine 2,3-dioxygenase in IFN-gamma-activated human macrophages: posttranslational regulation by pyrrolidine dithiocarbamate. *Journal of Immunology*, 166(10), 6332-6340.
- Ting, J. P. Y., Lovering, R. C., Alnemri, E. S., Bertin, J., Boss, J. M., Davis, B. K., Flavell, R. A., Girardin, S. E., Godzik, A., Harton J., Hoffman, H. M., Hugot, J. P., Inohara, N., MacKenzie, A., Maltais, L. J., Nunez, G., Ogura, Y., Otten, L., Philpott, D., Reed, J. C., Reith, W., Scheiber, S., Steimle, V. y Ward, P. A. (2008). The NLR Gene Family: A Standard Nomenclature. *Immunity*, 28(3), 285-287.
- Topalian, S. L., Drake, C. G. y Pardoll, D. M. (2015). Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. *Cancer Cell*, 27(4), 450-461.
- Trabanelli, S., Lecciso, M., Salvestrini, V., Cavo, M., Očadlíková, D., Lemoli, R. M. y Curti, A. (2015). PGE₂-Induced IDO1 Inhibits the Capacity of Fully Mature DCs to Elicit an *In Vitro* Antileukemic Immune Response. *Journal of Immunology Research*, 2015, 1-10.
- Tran, E., Turcotte, S., Gros, A., Robbins, P. F., Lu, Y. C., Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Somerville, R. P., Hogan, K., Hinricsh, C. S, Parkhurst, M. R., Yang, J. C. y Rosenberg, S. A. (2014). Cancer Immunotherapy

- Based on Mutation-Specific CD4+ T Cells in a Patient with Epithelial Cancer. *Science*, 344(6184), 641-645.
- Uyttenhove, C., Pilotte, L., Théate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T. y Van den Eynde, B. J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nature Medicine*, 9(10), 1269-1274.
- Van Baren, N. y Van den Eynde, B. J. (2015). Tumoral Immune Resistance Mediated by Enzymes That Degrade Tryptophan. *Cancer Immunology Research*, 3(9), 978-985.
- Viganò, E., Diamond, C. E., Spreafico, R., Balachander, A., Sobota, R. M. y Mortellaro, A. (2015). Human caspase-4 and caspase-5 regulate the one-step non-canonical inflammasome activation in monocytes. *Nature Communications*, 6(1), 8761.
- Vogelstein, B. y Kinzler, K. W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics: TIG*, 9(4), 138-141.
- Voronov, E., Shouval, D. S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C. A. y Apte, R. N. (2003). IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5), 2645-2650.
- Walunas, T. L., Lenschow, D. J., Bakker, C. Y., Linsley, P. S., Freeman, G. J., Green, J. M., Thompson, C. B. y Bluestone, J. A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, 1(5), 405-413.

- Wang, H., Wang, Y., Du, Q., Lu, P., Fan, H., Lu, J. y Hu, R. (2016). Inflammasome-independent NLRP3 is required for epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells. *Experimental Cell Research*, 342(2), 184-192.
- Wang, L., Zhang, L. F., Wu, J., Xu, S. J., Xu, Y. Y., Li, D., Lou., J. T. y Liu, M. F. (2014). IL-1 β -Mediated Repression of microRNA-101 Is Crucial for Inflammation-Promoted Lung Tumorigenesis. *Cancer Research*, 74(17), 4720-4730.
- Wang, Y., Kong, H., Zeng, X., Liu, W., Wang, Z., Yan, X., Wang, H. y Xie, W. (2016). Activation of NLRP3 inflammasome enhances the proliferation and migration of A549 lung cancer cells. *Oncology Reports*, 35(4), 2053-2064.
- Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123(3191), 309-314.
- Wei, Q., Mu, K., Li, T., Zhang, Y., Yang, Z., Jia, X., Zhao, W., Huai, W., Gou, P. y Han, L. (2014). Deregulation of the NLRP3 inflammasome in hepatic parenchymal cells during liver cancer progression. *Laboratory Investigation*, 94(1), 52-62.
- Weinberg, R. A. (2014). *The biology of cancer*. Nueva York, Estados Unidos: Garland Science.
- Weninger, W., Manjunath, N. y Von Andrian, U. H. (2002). Migration and differentiation of CD8+ T cells. *Immunological Reviews*, 186, 221-233.
- Wethmar, K., Smink, J. J. y Leutz, A. (2010). Upstream open reading frames: Molecular switches in (patho)physiology. *BioEssays*, 32(10), 885-893.
- Yan, W., Chang, Y., Liang, X., Cardinal, J. S., Huang, H., Thorne, S. H., Monga, S., Geller, D. A., Lotze, M. T. y Tsung, A. (2012). High-mobility group box

1 activates caspase-1 and promotes hepatocellular carcinoma invasiveness and metastases. *Hepatology*, 55(6), 1863-1875.

Zheng, Y., Manzotti, C. N., Liu, M., Burke, F., Mead, K. I. y Sansom, D. M. (2004).

CD86 and CD80 Differentially Modulate the Suppressive Function of Human Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 172(5), 2778-2784.

Zhiyu, W., Wang, N., Wang, Q., Peng, C., Zhang, J., Liu, P., Ou, A., Zong, S.,

Cordero, M. D. y Lin, Y. (2016). The inflammasome: an emerging therapeutic oncotarget for cancer prevention. *Oncotarget*, 7(31), 50766-50780.

Zhu, J. y Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*,

112(5), 1557-1569.