



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



# TESIS DE MAESTRÍA

## *Estudio de mecanismos efectores y contra-reguladores mediados por la sobre-activación del inflammasoma durante la respuesta anti-tumoral*

**Lic. Valentina Pérez**

Laboratorio de Inmunoregulación e Inflamación- Institut  
Pasteur Montevideo/Depto. de Inmunobiología,  
Facultad de Medicina, Udelar

**Tutora: Dra. Mercedes Segovia**

**Co-tutora: Dra. Sofía Russo**

**Tribunal: Dr. Otto Pritsch (presidente)**

**Dr. Sergio Bianchi**

**Dra. Cecilia Sóñora**

**Febrero 2021**

# ÍNDICE

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUMEN .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>  | <b>6</b>  |
| 1. <i>Cáncer</i> .....   | 6         |
| 1.1 Generalidades .....  | 6         |
| 1.2 Distintivos del cáncer.....  | 7         |
| 1.3 Microambiente tumoral.....   | 9         |
| 2. <i>Sistema inmune en el cáncer</i> .....  | 13        |
| 2.1 Generalidades .....  | 13        |
| 2.2 Mecanismos efectores.....  | 15        |
| 2.2.1 El inflammasoma .....  | 15        |
| 2.2.2 Llinfocitos Th17.....  | 18        |
| 2.3 Mecanismos contra-reguladores: puntos de control inmunológico .....  | 22        |
| 2.3.1 IDO1.....  | 25        |
| 2.3.2 TME176B.....   | 30        |
| <b>HIPÓTESIS GENERAL.....</b>  | <b>33</b> |
| <b>OBJETIVOS.....</b>  | <b>34</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>   | <b>36</b> |
| <i>Cultivo de líneas celulares</i> .....   | 36        |
| <i>Modelos tumorales y tratamientos</i> .....  | 36        |
| <i>RT-PCR cuantitativa</i> .....   | 38        |
| <i>Western Blot</i> .....  | 40        |
| <i>Citometría de flujo</i> .....   | 41        |
| <i>Análisis de producción de quinurenina</i> .....   | 43        |
| <i>Análisis estadísticos</i> .....   | 44        |
| <b>RESULTADOS.....</b>   | <b>45</b> |
| <i>Parte 1: Rol de la IL-17 durante la respuesta anti-tumoral mediada por la sobre-activación del inflammasoma y el bloqueo de puntos de control inmunológico.....</i> | <i>45</i> |
| <i>Parte 2: Mecanismos contra-reguladores mediados por IDO1 desencadenados por la sobre-activación del inflammasoma .....</i>  | <i>50</i> |
| 2.1 Expresión de IDO1 en tumores de animales <i>Tmem176b<sup>-/-</sup></i> y WT.....   | 50        |
| 2.1.1 Las células tumorales son las principales contribuyentes a la expresión aumentada de IDO1 en los animales <i>Tmem176b<sup>-/-</sup></i> .....                    | 51        |

|   |            |
|---|------------|
| 2.1.2 El nivel de expresión de IDO1 a nivel de la célula tumoral es relevante para el desencadenamiento de este mecanismo contra-regulador entumores de animales <i>Tmem176b</i> <sup>-/-</sup> ..... | 57         |
| 2.2 Expresión de IDO1 en tumores de animales tratados con BayK8644.....   | 60         |
| 2.2.1 Las células tumorales son las principales contribuyentes a la expresión aumentada de IDO1 en los animales tratados con BayK8644 .....   | 62         |
| 2.2.2 Las células T CD8 <sup>+</sup> tienen un rol relevante en la expresión aumentada de IDO1+ en las células tumorales de animales tratados con BayK8644 .....                                      | 68         |
| 2.2.3 La terapia con el inhibidor de IDO1 1-MT podría dar lugar a una mejora de los efectos anti-tumorales del BayK8644.....  | 72         |
| <b>DISCUSIÓN .....</b>  | <b>75</b>  |
| <i>Parte 1: Rol de la IL-17 durante la respuesta anti-tumoral mediada por la sobre-activación del inflammasoma y el bloqueo de puntos de control inmunológico.....</i>                                | <i>75</i>  |
| <i>Parte 2: Mecanismos contra-reguladores mediados por IDO1 desencadenados por la sobre-activación del inflammasoma .....</i>   | <i>82</i>  |
| <b>CONCLUSIONES .....</b>   | <b>92</b>  |
| <b>REFERENCIAS.....</b>   | <b>94</b>  |
| <b>ANEXO .....</b>  | <b>112</b> |
| <i>Anexo 1: Figuras Suplementarias .....</i>  | <i>112</i> |
| <i>Anexo 2: Targeting TMEM176B Enhances Antitumor Immunity and Augments the Efficacy of Immune Checkpoint Blockers by Unleashing .....</i>  | <i>116</i> |

## RESUMEN

---

La manipulación del sistema inmune utilizando inmunoterapias para desencadenar respuestas anti-tumorales ha revolucionado el tratamiento de una variedad de cánceres, sin embargo, pocos pacientes se benefician de las terapias desarrolladas hasta el momento. Por este motivo, es necesario identificar nuevos blancos terapéuticos en la inmunidad anti-tumoral.

En nuestro grupo demostramos que TMEM176B es un canal catiónico intracelular con capacidades inmunorreguladoras, y que la delección génica de *Tmem176b* o su bloqueo farmacológico con el compuesto BayK8644, ocasiona una sobre-activación del inflammasoma, que favorece el rechazo de tumores trasplantables y mejora el efecto anti-tumoral de las terapias de bloqueo de puntos de control. A su vez, evidenciamos que la delección génica de *Tmem176b* induce la acumulación de linfocitos Th17 en el ganglio linfático drenante del tumor y el rechazo tumoral mediado por IL-17, cuya expresión por linfocitos T CD4<sup>+</sup> se ha asociado a la respuesta clínica al bloqueo de PD-1, en pacientes portadores de melanoma metastásico. Por otro lado, en mi tesina de grado demostramos que los tumores de ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> presentan una mayor expresión y actividad enzimática de indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO1) respecto a ratones WT. IDO1 es una enzima capaz de degradar el triptófano por la vía de la quinurenina, y se ha identificado como un mecanismo contra-regulador relevante desencadenado durante las inmunoterapias anti-tumorales.

Esto nos llevó a plantear la hipótesis de que la sobre-activación del inflammasoma, dada por la inhibición de TMEM176B, genera respuesta anti-tumoral a través de la activación de linfocitos Th17, pero que podrían existir mecanismos contra-reguladores mediados por IDO1 a nivel tumoral que pueden disminuir este efecto.

Teniendo esta hipótesis en mente, nos planteamos como objetivos, por un lado, evaluar el rol de la IL-17 durante las terapias anti-tumorales basadas en la sobre-activación del inflamasoma y el bloqueo de puntos de control inmunológico, y por otro, estudiar la relevancia de los mecanismos contra-reguladores mediados por IDO1 durante la respuesta anti-tumoral generada por la sobre-activación del inflamasoma.

En lo que refiere al primer objetivo, demostramos que durante el tratamiento con anti-PD-1, los animales *Il-17a<sup>-/-</sup>* presentan una mejor respuesta anti-tumoral, con una mayor supervivencia que los animales WT. Sin embargo, al evaluar estos parámetros en ratones tratados con anti-PD-1 en combinación con BayK8644, observamos que los animales con la delección génica de *Il-17a* responden peor al tratamiento, presentando una supervivencia significativamente menor que los animales WT. Estos resultados parecen indicar que en ausencia de la sobre-activación del inflamasoma mediada por el BayK8644, prevalecen los efectos pro-tumorales de la IL-17, siendo de esta forma perjudicial para el tratamiento con anti-PD-1. En contraste, en un contexto de sobre-activación del inflamasoma, la IL-17 parecería tener un efecto anti-tumoral, relevante para favorecer los efectos de la terapia con anti-PD-1.

Respecto al segundo objetivo, evidenciamos que, al igual que como sucede para los animales *Tmem176b<sup>-/-</sup>*, los ratones con tumor trasplantado, tratados con BayK8644 presentan un aumento significativo en la expresión y actividad de IDO1 a nivel tumoral, respecto a los animales tratados con vehículo. Además, identificamos a las células tumorales como las principales productoras de IDO1 a nivel tumoral, y demostramos que esta población celular es la única que presenta una expresión de IDO1 significativamente mayor en los animales *Tmem176b<sup>-/-</sup>* y tratados con BayK8644, respecto a su grupo control. En línea con estos resultados, observamos que la expresión basal de IDO1 a nivel de la célula tumoral parece ser necesaria para la expresión aumentada de IDO1 en los tumores de los animales *Tmem176b<sup>-/-</sup>*.

Adicionalmente, evidenciamos que el infiltrado de células T CD8<sup>+</sup> a nivel tumoral se correlaciona de forma positiva con la expresión de IDO1 en células tumorales de animales tratados con BayK8644 o vehículo, pero no con la expresión de esta enzima en las células no tumorales. Además, demostramos que el aumento en la expresión de IDO1 en los tumores de ratones tratados con BayK8644 es dependiente de las células T CD8<sup>+</sup>, ya que su depleción *in vivo* lleva a una disminución en los niveles de expresión de esta enzima a nivel tumoral.

Estos resultados demuestran que la sobre-activación del inflammasoma, mediada por la delección génica de *Tmem176b* o por su inhibición farmacológica con BayK8644, genera un aumento en la expresión y actividad de IDO1 a nivel de la célula tumoral, constituyendo un mecanismo contra-regulador relevante, dependiente de células T CD8<sup>+</sup>.

# INTRODUCCIÓN

---

## 1. Cáncer

### 1.1 Generalidades

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).

Esta enfermedad se caracteriza por la proliferación y el comportamiento celular alterados, lo cual es causado por cambios irreversibles que llevan a las células a adquirir un fenotipo maligno. Dicho proceso desemboca en un fallo fisiológico, que es incompatible con la vida del portador (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, ocasionada por la acumulación de alteraciones no letales (Vogelstein y Kinzler, 1993). La masa tumoral es originada por la expansión de una célula que sufrió daño en su material genético, como consecuencia de la acción de diferentes agentes. Esto lleva a una alteración del programa genético celular, que favorece 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) y susceptibles a

una alta tasa de mutaciones aleatorias durante la expansión clonal, lo cual facilita la progresión hacia un fenotipo maligno.

## **1.2 Distintivos del cáncer**

Las células tumorales, aunque ampliamente diversas, presentan características biológicas compartidas, que adquieren durante diferentes etapas del desarrollo tumoral, y permiten la proliferación celular inadecuada y el crecimiento de poblaciones de células neoplásicas. Estas características fueron conceptualizadas por Hanahan y Weinberg, en lo que los autores denominaron los “distintivos del cáncer” (Hanahan y Weinberg, 2000, 2011, 2017)

Una de las características típicas del cáncer es la proliferación celular inadecuada. Dicha proliferación es en parte debida al mantenimiento crónico de señales inductoras de proliferación, lo cual constituye uno de los distintivos del cáncer descrito por Hanahan y Weinberg; este fenómeno favorece la entrada y la progresión del ciclo celular de las células tumorales (Hanahan y Weinberg, 2017).

La capacidad de las células tumorales de resistir a la muerte celular programada es otro de distintivo descrito por Hanahan y Weinberg (Hanahan y Weinberg, 2017). Este constituye un mecanismo celular intrínseco 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 programada 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). En adición al escape de la muerte celular programada, las células tumorales también se distinguen por su inmortalidad, lo cual les otorga un potencial replicativo ilimitado. Esta inmortalidad tiene origen en la habilidad de las células malignas de escapar de la senescencia celular y la fase de muerte celular posterior (Hanahan y Weinberg, 2017).



Otra característica distintiva de las células tumorales es su capacidad para inducir la angiogénesis (Hanahan y Weinberg, 2017), lo cual permite el mantenimiento del suministro de oxígeno y nutrientes al tumor, y, en consecuencia, favorecen el crecimiento tumoral (Hanahan y Folkman, 1996). Por otro lado, 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, 2017).

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. Este proceso lleva a la invasión de los tejidos adyacentes, y de los vasos linfáticos y sanguíneos, lo cual posibilita que las células tumorales invadan sitios anatómicamente distantes (Hanahan y Weinberg, 2017).

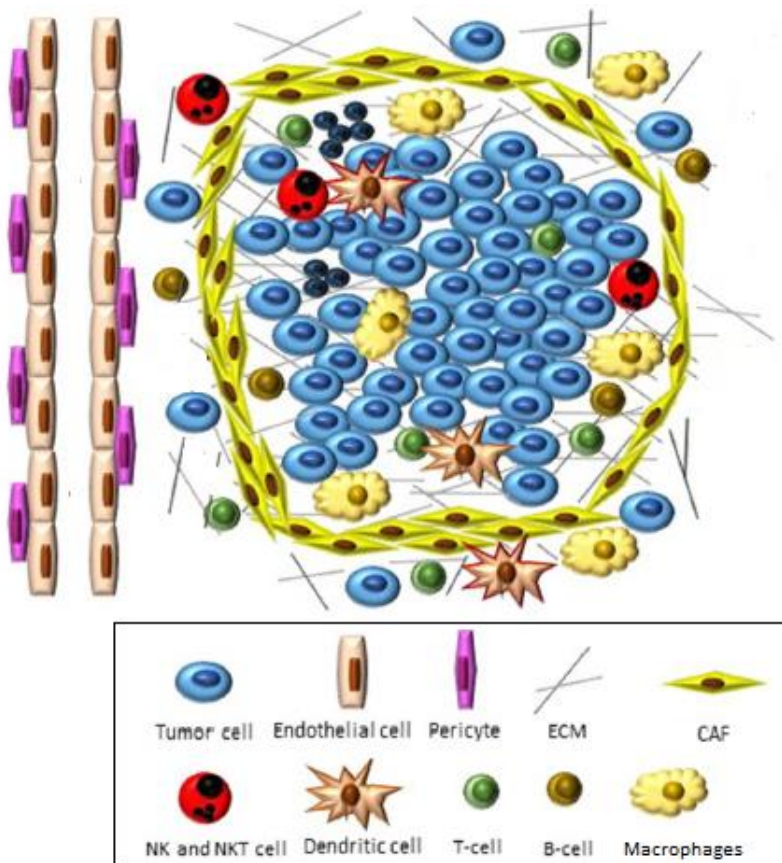
Finalmente, el último distintivo de las células tumorales descrito por Hanahan y Weinberg, es la capacidad que estas poseen de escapar de la destrucción mediada por el sistema inmune (Hanahan y Weinberg, 2017). El sistema inmune juega un rol fundamental como barrera a la progresión tumoral (Ehrlich y Himmelweit, 1956), sin embargo, en muchos casos los tumores pueden escapar de esta barrera progresando hacia la enfermedad. Estos fenómenos han llevado a que, en los últimos años, se hiciera foco en las inmunoterapias anti-tumorales, como potenciales tratamientos para favorecer la eliminación tumoral mediante el potenciamiento de la acción del sistema inmunológico; dentro de estas, destacan las inmunoterapias de bloqueo de puntos de control inmunológico (ICBs). Dichas terapias y sus mecanismos de acción serán abordadas a lo largo de esta tesis.

Cabe destacar que el sistema inmune también puede jugar un rol pro-tumoral a través del infiltrado de células inmunes que causan una inflamación que promueve el desarrollo tumoral. Este infiltrado pro-tumoral es capaz de otorgar señales proliferativas, de supervivencia, y pro-angiogénicas, que facilitan la supervivencia e invasión de las células tumorales (Hanahan y Weinberg, 2017). Los diferentes roles que puede adquirir el

sistema inmune durante el desarrollo tumoral están determinados en gran medida por el microambiente en el cuál se desarrolla el tumor, y es en lo que nos centraremos a continuación.

### 1.3 Microambiente tumoral

Los tumores sólidos son estructuras complejas, compuestas de células tumorales y los diversos componentes que las rodean; el conjunto de las células tumorales y estos diferentes factores es lo que se denomina microambiente tumoral (TME). El TME está formado por células tumorales, células endoteliales y pericitos, fibroblastos asociados al tumor (CAFs) y células del sistema inmune, así como componentes de la matriz extracelular (ECM), la cual provee de soporte e información adecuada para el desarrollo tumoral (Baghban et al., 2020; Galli et al., 2020; Douglas Hanahan y Weinberg, 2017; Jahanban-Esfahlan et al., 2017; Jahanban-Esfahlan et al., 2018) (Figura 1).



**Figura 1. El microambiente tumoral (TME).** El TME de la mayor parte de los tumores sólidos está constituido por diferentes tipos celulares, así como componentes de la matriz extracelular (ECM), que encierran y sirven de sostén para la estructura tumoral. Dentro de los componentes celulares del TME se encuentran las células tumorales, las células endoteliales y pericitos, los fibroblastos asociados al tumor (CAFs) y diferentes células del sistema inmune (células NK, células dendríticas, células T, células B y macrófagos). *Extraído y modificado de Baghban et al, 2020.*

Durante la progresión tumoral tiene lugar una interacción dinámica entre las células tumorales y el microambiente tumoral. Entre los diferentes componentes del TME existe una compleja señalización, a través de la cuál las células tumorales son capaces de controlar la funcionalidad de dichos elementos (Baghban et al., 2020). Las interacciones entre las células tumorales y su microambiente pueden darse de forma bidireccional a través de contactos célula-célula o de mediadores solubles (Baghban et al., 2020).

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).

Las células tumorales presentes en el TME son ampliamente heterogéneas, tanto a nivel genético como funcional (Hanahan y Weinberg, 2017). En este sentido, se ha evidenciado que dentro de estas células existe una subclase denominada células madre tumorales (CSC), que presentan marcadores de células madre como CD24 y CD133 (Al-Hajj et al., 2003; Yu et al., 2012) y son capaces de generar tumores al ser inyectadas en animales (Cho y Clarke, 2008; Lobo et al., 2007).

En el componente no tumoral del TME esto es, el estroma tumoral, es el sitio donde se encuentra la mayor heterogeneidad. Este compartimento está compuesto por varias clases de células: las células endoteliales tumorales, los pericitos, los fibroblastos asociados a tumor y las células inmunes que infiltran el tumor (Hanahan y Weinberg, 2017).

Las células endoteliales tumorales forman la capa interior de los vasos sanguíneos de los tumores sólidos en desarrollo (Salazar y Zabel, 2019). Estas células pueden producirse directamente por diferenciación de las células tumorales, y son esenciales para dar lugar a la llegada de nutrientes al tumor, la infiltración inmune del mismo y la organización del estroma tumoral (Abbasi, Mehdipour, et al., 2015). Los pericitos por su parte se

encuentran en la superficie de las células endoteliales (Abbasi-Helli, et al., 2015), y tienen un rol fundamental en la angiogénesis durante el desarrollo tumoral. Adicionalmente, estas células son capaces de favorecer el reclutamiento de diferentes células del sistema inmune al tumor (Baluk et al., 2003; Kloc et al., 2015). Ambas poblaciones celulares son capaces de dar lugar a la producción de factores angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), para favorecer los procesos anteriormente mencionados (Zhang et al., 2003).

Por su parte, los fibroblastos asociados al tumor (CAFs) se encuentran en contacto con las células tumorales, y juegan un rol central en el desarrollo tumoral, reduciendo la apoptosis y aumentando la proliferación y migración de las células tumorales (Kalluri, 2016; Lee et al., 2018). Estas células producen factores solubles relevantes para la progresión tumoral, como ser el TGF- $\beta$ , la IL-6 y la quimioquina CXCL12 (Baghban et al., 2020).

Como se explicó previamente, el sistema inmune es un actor principal durante el desarrollo tumoral, y existen una amplia variedad de células inmunes que componen el TME, entre ellas, células dendríticas (DCs), macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales (NK), linfocitos B y linfocitos T (Hanahan y Weinberg, 2011, 2017). En base a la composición de células inmunes en el TME se puede hablar de tumores inflamados, inmuno-excluidos o inmuno-desiertos. Esto es relevante, ya que tiene relación con el pronóstico de la patología, y posee una fuerte influencia en la respuesta a ICBs (Binnewies et al., 2018; Chen et al., 2016).

El fenotipo inflamado consiste en la acumulación de células inflamatorias, como ser las células T CD8<sup>+</sup> y T CD4<sup>+</sup> en el parénquima tumoral, aunque también se ha asociado a la presencia de mecanismos supresores, incluidos el infiltrado de células T reguladoras (Treg) y células mieloides supresoras (MDSCs), que llevan a la disfunción de las células inmunes y a su agotamiento (Jiang et al., 2018). El fenotipo inmuno-excluido se

caracteriza por una gran cantidad de células inmunológicas, como ser linfocitos T CD8<sup>+</sup>, linfocitos T CD4<sup>+</sup>, en el estroma que rodea al tumor (Galli et al, 2020); las características de este fenotipo se han reportado como biomarcadores favorables para la respuesta a las ICBs. El fenotipo inmuno-desierto refiere a la falta de una respuesta anti-tumoral en el TME, y se caracteriza por la presencia de poblaciones celulares inhibitoras, como las células T reguladoras (Treg) (Sprooten et al., 2019). Queda claro entonces, que el rol del sistema inmune durante el desarrollo tumoral depende en gran medida de la composición del mismo en el TME, lo cual está modulado por las diferentes señales provenientes de los diversos componentes del TME, como ser factores liberados por las células endoteliales tumorales o los fibroblastos asociados al tumor (Johansson-Percival et al., 2018; L. Zhang et al., 2003).

Dado este importante rol de los diversos componentes del TME en el desarrollo tumoral, 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. En este trabajo nos centraremos en el componente inmunológico del TME.

## 2. Sistema inmune en el cáncer

### 2.1 Generalidades

El sistema inmune posee un rol central en la eliminación de células tumorales. Este rol fue propuesto por Paul Ehrlich (Ehrlich y Himmelweit, 1956), y posteriormente estudiado en mayor detalle por Lewis Thomas y Frank MacFarlane Burnet, quienes propusieron el concepto de inmunovigilancia, el cual refiere a 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, 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, en el cual células tumorales experimentan cambios y mutaciones como resultado de la presión selectiva impuesta por el sistema inmune, lo cual les permite sobrevivir, impidiendo la eliminación completa del tumor; 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).

Como se mencionó anteriormente, aunque el sistema inmune posee un rol anti-tumoral fundamental, que puede ser mediado tanto por la inmunidad innata como adaptativa (Palucka y Coussens, 2016), se ha demostrado que también es capaz de actuar promoviendo el desarrollo tumoral. Existen una gran cantidad de células inmunitarias en el TME, 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; Johansson-Denardo, 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).

Durante el desarrollo tumoral se reclutan células inmunes al tejido, como macrófagos, neutrófilos, células NK, 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 en esta eliminación, las células tumorales son retenidas en el TME (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 anti-tumorales. En este contexto se secretan diversas citoquinas como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), las interleuquinas (IL) IL-4, IL-13, IL-8 e IL-10, la linfopoyetina del estroma tímico (TSLP) y enzimas como la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO1). Estas moléculas poseen efectos inmuno-supresores a nivel del TME, imposibilitando la activación de células T anti-tumorales, y ocasionando la generación de células Treg, entre otros mecanismos (Zhu y Paul, 2008). Además, en este contexto, las diferentes células del sistema inmune reclutadas al TME desencadenan la producción de factores angiogénicos (VEGF), de crecimiento y/o de supervivencia (EGF-factor de crecimiento endotelial, TNF $\alpha$ -factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ), 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-DeNardo, et al., 2008; Mantovani, 2010; Murdoch et al., 2008;. Qian y Pollard, 2010). En conjunto, estos factores propician la progresión tumoral.

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 (De Palma et al., 2007; Egeblad et al.,

2010; Hanahan y Weinberg, 2017; Mantovani, 2010; Mantovani et al., 2008; Murdoch et al., 2008; Qian y Pollard, 2010).

## **2.2 Mecanismos efectores**

Si bien, como se mencionó en la sección anterior, son diversos los actores del sistema inmune que poseen un rol en la inmunidad anti-tumoral, en este trabajo nos centraremos en el papel del inflamasoma y los linfocitos Th17, como mecanismos inmunológicos efectores, relevantes durante este proceso.

### **2.2.1 El inflamasoma**

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) y/o a daño (DAMPs), 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 $\beta$  e IL-18 (Schroder y Tschopp, 2010) y a una forma particular de muerte celular, denominada piroptosis (Strowig et al., 2012).

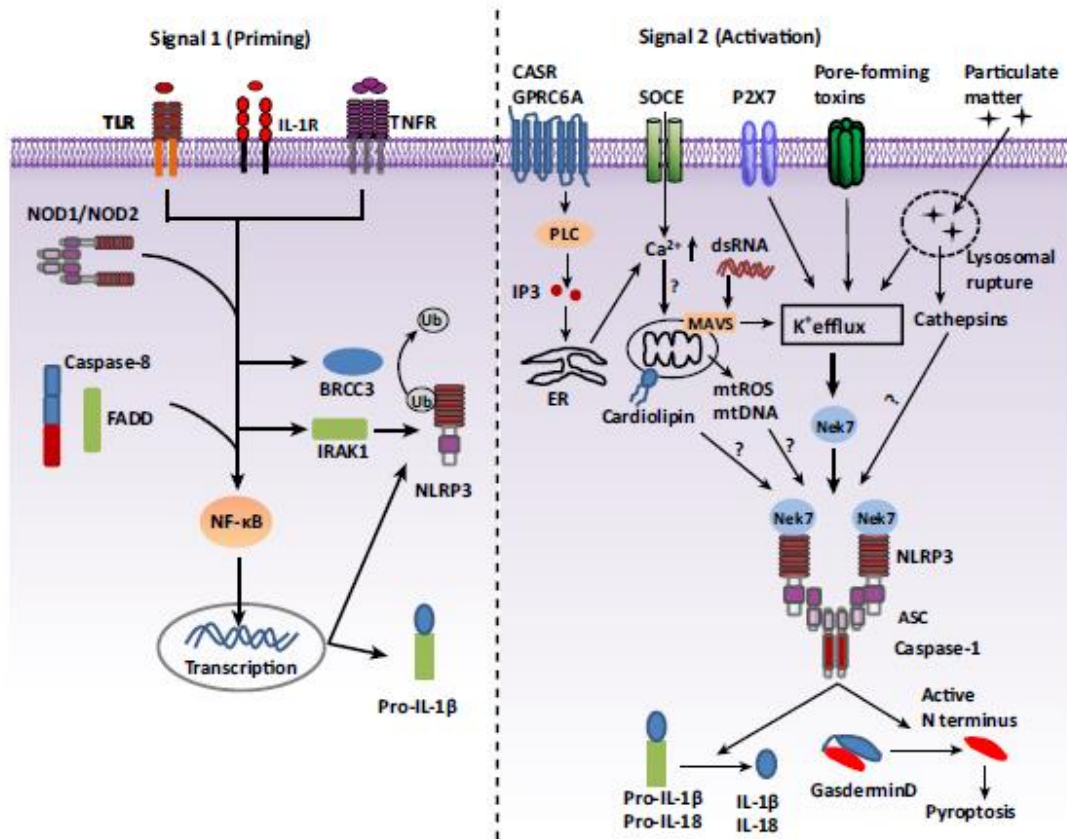
Los inflamasomas se activan por el reconocimiento de PAMPs o DAMPs, lo cual lleva a la oligomerización de receptores NLR (receptores de tipo NOD) o AIM2 (ausente en melanoma 2), y su subsecuente interacción con la proteína adaptadora ASC (proteína de tipo speck asociada a la apoptosis que contiene CARD), la cual a su vez interacciona con el dominio CARD (dominio de activación y reclutamiento de la caspasa) 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 $\beta$  e IL-18 (pro IL-1 $\beta$  y pro IL-18), para generar las IL-1 $\beta$  e IL-18 pro-



inflamatorias (Schroder y Tschopp, 2010; Zhiyu et al., 2016). Esta forma de activación de los inflamasomas se conoce como canónica.

Dentro de los inflamasomas, el más estudiado, posiblemente debido a la relevancia del mismo en la base de estados fisiopatológicos en humanos (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). 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 sensados por NLRP3. Dentro de estos eventos se han propuesto el eflujo de  $K^+$  y/o el influjo de  $Ca^{2+}$ , fenómenos que ocasionan daño a nivel mitocondrial, lo cual deriva en un eflujo de  $Cl^-$  que regula el ensamblaje del inflamasoma (Gong et al., 2018). Adicionalmente las especies reactivas del oxígeno (ROS), la disfunción mitocondrial y la ruptura lisosomal se han reportado como eventos capaces de desencadenar la activación de este inflamasoma (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 $\beta$  y pro-IL-18, a través de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, 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 $\beta$  e IL-18. Las señales para ambos pasos de la activación están dadas por diversos PAMPs y DAMPs (He et al., 2016) (Figura 2).



**Figura 2. Activación del inflammasoma NLRP3.** La activación del inflammasoma NLRP3 se da mediante dos señales, una primera señal que lleva a la síntesis de NLRP3, pro-IL1β 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-1β 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 inflammasomas 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. Estos complejos, mediante la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, pueden promover la eliminación de las células malignas a través de la activación de células efectoras anti-tumorales, sin embargo, estas mismas citoquinas son capaces de dar lugar a una inflamación carcinogénica (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 opuestos (He et al., 2018).

### *2.2.2 Llinfocitos Th17*

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 les permite 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), tanto en los ganglios linfáticos como en el tumor. Cuando las DCs presentan los antígenos tumorales a células T CD8<sup>+</sup> y T CD4<sup>+</sup> en un contexto co-estimulador, caracterizado por la presencia de moléculas como CD80, CD86, CD70 y 4-1BB, y citoquinas como la IL -12, interferones de tipo I e IL-15, los linfocitos pueden diferenciarse a linfocitos T efectores, capaces de dar lugar a la respuesta anti-tumoral. A pesar de que las células T CD8<sup>+</sup> se consideran las principales células efectoras anti-tumorales, ya que dan lugar a células T citotóxicas (CTLs), capaces de inducir la

apoptosis de las células tumorales (Appay et al., 2008; Steinman, 2012), se ha demostrado que existen diversas poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que juegan un rol fundamental durante la respuesta inmune anti-tumoral (T. Li et al., 2020).

Dentro de las células T CD4<sup>+</sup> se ha demostrado que son varias las subpoblaciones capaces de desencadenar respuestas anti-tumorales. Clásicamente, esta capacidad se atribuyó principalmente a la población Th1, caracterizada por la expresión de factor de transcripción T-bet y por una fuerte respuesta mediada por interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) (Iwata et al., 2017). Se ha demostrado que esta población celular es capaz de ejercer fuertes respuestas antitumorales dependientes de IFN $\gamma$  (Melssen y Slingluff, 2017) por varios mecanismos (Li et al., 2020). Sin embargo, en los últimos años se han identificado varias otras poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> con acción anti-tumoral, dentro de las cuales se encuentran las células Th17 (Zou y Restifo, 2010) y Th9 (Y. Lu et al., 2012, 2018); en este trabajo nos centraremos en la población Th17.

Las células Th17 se han asociado clásicamente como mediadoras de las respuestas auto-inmunes y parte de la inmunidad de barrera en las mucosas, y se caracterizan por la expresión del factor de transcripción ROR $\gamma$ t y la secreción de IL-17 (Dolff et al., 2019; Zou y Restifo, 2010). Cabe destacar que también se han descrito varios otros factores de transcripción asociados esta población celular (Asadzadeh et al., 2017; Stockinger y Omenetti, 2017).

En los últimos años se han identificado a las células Th17 como actores relevantes durante el desarrollo tumoral. En este sentido, se ha evidenciado que las mismas se encuentran presentes en varios tipos de tumores sólidos (Hahn et al., 2011; Noonan et al., 2010; Su et al., 2010; Tosolini et al., 2011).

Las células Th17 son capaces de promover la activación de CTLs mediante la secreción de IL-2 e induciendo la expresión de IL-6 e IL-12 (Munegowda et al., 2011; Asadzadeh

et al., 2017; Martin-Orozco et al., 2009.; Muranski et al., 2008). A su vez, dichas células son capaces de estimular a las células tumorales, las células epiteliales y estromales para producir citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , entre otras, facilitando el reclutamiento de células dendríticas, células NK, macrófagos y neutrófilos, capaces de impedir la progresión tumoral (Asadzadeh et al., 2017; C. Chen y Gao, 2019; Kryczek et al., 2009; Martin-Orozco et al., 2009). Adicionalmente, se ha demostrado que además de IL-17, las células Th17 pueden secretar INF $\gamma$  y TNF $\alpha$  (Kryczek et al., 2009), citoquinas que se ha demostrado que poseen efectos anti-tumorales, y que son capaces de reforzar la respuesta anti-tumoral mediada por linfocitos T CD8 $^+$  (Martin-Orozco et al., 2009). Por otra parte, se ha reportado que la IL-17, a través de la inducción de la secreción tumoral de quimioquinas como CXCL9 y CXCL10, favorece el reclutamiento a nivel tumoral de linfocitos T CD8 $^+$  y células NK (Kryczek et al., 2009; Lu et al., 2013), poblaciones celulares sumamente relevantes para la eliminación de las células tumorales. En este sentido, también se ha demostrado que la IL-17 es capaz de promover la actividad de las células NK (Hirahara et al., 2000; Honorati et al., 2003; Lu et al., 2013).

El reporte de un caso clínico reciente sugiere un rol de la IL-17 en la eficacia de la terapia con ICBs en pacientes con cáncer; en el paciente descrito, portador de cáncer de colon, el bloqueo de la IL-17, realizado para paliar los efectos secundarios de la terapia, llevó a una reducción de la actividad anti-tumoral que se había obtenido con el tratamiento (Esfahani y Miller, 2017). En este sentido, una alta expresión de IL-17 por linfocitos T CD4 $^+$  se ha asociado a la respuesta clínica al tratamiento con ICB en pacientes portadores de melanoma metastásico (Krieg et al., 2018).

A pesar de los claros efectos anti-tumorales de las células Th17 y la IL-17, el rol de estas células y su citoquina asociada en la inmunidad anti-tumoral es dual, ya que se ha descrito que no solo poseen efectos anti-tumorales sino que también pueden tener acciones pro-tumorales (Amicarella et al., 2017; Chang et al., 2014; Punkenburg et al.,

2016; Qian et al., 2017). En este sentido, se ha reportado que algunas células Th17 pueden co-expresar el factor de transcripción típico de células T reguladoras FoxP3, lo cual puede ir en detrimento de la respuesta anti-tumoral (Blatner et al., 2012). Adicionalmente, se ha demostrado que la IL-17, principal citoquina secretada por las células Th17, es capaz de promover la proliferación de las células tumorales de forma indirecta, mediante la acción de la IL-6 (L. Wang et al., 2009). Por otro lado, la IL-17 también es capaz de promover el desarrollo tumoral estimulando directamente la proliferación, viabilidad y migración de las células tumorales (Lotti et al., 2013; Wang et al., 2014). A su vez, se ha demostrado que la IL-17 es capaz de inducir angiogénesis a nivel tumoral (Pan et al., 2015), un proceso esencial durante el desarrollo tumoral.

Estos efectos, en cierto sentido contradictorios, de la respuesta Th17 en la inmunidad anti-tumoral pueden deberse a la existencia de diferentes sub-poblaciones de células Th17, con funciones opuestas. La existencia de los diferentes fenotipos de células Th17 es posible por la gran plasticidad que estas células poseen, y su generación depende del ambiente de citoquinas en el cual se encuentran (Muranski y Restifo, 2013).

Se ha reportado que las células Th17, bajo estímulos pro-inflamatorios como la IL-1 $\beta$ , pueden transicionar hacia un fenotipo Th1 (células Th1 “ex-Th17”) productor de IL-17 e INF $\gamma$  (Uchiyama et al., 2017). Este fenotipo es denominado Th17 patogénico, ya que, debido a su potente actividad pro-inflamatoria se las ha asociado a la respuesta presente en enfermedades inflamatorias y auto-inmunes (Maddur et al., 2012). En un contexto tumoral, esta característica les otorga a dichas células Th17 la capacidad de poder ejercer fuertes efectos anti-tumorales.

Por otro lado, frente a estímulos como el TGF- $\beta$ , los linfocitos Th17 pueden diferenciarse a células Treg “ex-Th17”, FoxP3<sup>+</sup> productoras de IL-17 (Murugaiyan y Saha, 2009). Estas células “ex-Th17” actúan como una fuente importante de células T reguladoras a nivel

tumoral (Downs-Canner et al., 2017), y son capaces de producir, junto a la IL-17, IL-10, una citoquina con potentes actividades inmuno-reguladoras (Wu et al., 2018). De esta manera, este fenotipo de células Th17 es capaz de ejercer fuertes acciones inmuno-reguladoras, que perjudican la respuesta efectora anti-tumoral. Por el rol de estos mecanismos inmuno-reguladores en las enfermedades inflamatorias y auto-inmunes, en las cuales se describió por primera vez la acción de las células Th17, este fenotipo Treg “ex-Th17” es denominado no patológico (McGeachy et al., 2007). Sumado a este rol inmuno-regulador, se ha demostrado que estas células Treg son capaces de inducir angiogénesis (Facciabene et al., 2012), lo cual juega también va en detrimento de la respuesta anti-tumoral.

### ***2.3 Mecanismos contra-reguladores: puntos de control inmunológico***

Como se ha mencionado previamente, el sistema inmune posee un rol fundamental en la eliminación de las células tumorales. Sin embargo, se ha demostrado que a medida que se desencadenan estos mecanismos anti-tumorales, tienen lugar diversos fenómenos contra-reguladores, que van en detrimento de la eliminación tumoral.

Dentro de estos mecanismos, se han descrito diferentes vías 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. Estas moléculas tienen un rol fisiológico, central en la regulación de la activación de los linfocitos T a nivel periférico, comprendiendo un mecanismo de tolerancia periférica. Estos mecanismos de tolerancia son esenciales para impedir la activación de linfocitos T frente a antígenos propios, lo cual es fundamental para prevenir respuestas de auto-inmunidad (Fife y Bluestone, 2008; Goldrath y Bevan, 1999). En el cáncer, las células tumorales han tomado ventaja de estos diversos mecanismos de la tolerancia periférica, para así evadir su eliminación por el sistema inmune, a pesar de poder ser reconocidas por el mismo (Dunn et al., 2004b; Poschke et al., 2011).

Dos de los puntos de control inmunológico mejor caracterizados son CTLA-4 (antígeno 4 del linfocito T citotóxico) (Leach et al., 1996; Walunas et al., 1994), y PD-1 (proteína 1 de muerte celular programada) (Freeman et al., 2000).

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). Adicionalmente, CTLA-4 es expresado de forma constitutiva por células Treg, siendo importante para la función reguladora de dichas células (Piccirillo y Shevach, 2004; Takahashi et al., 2000). En este sentido, la expresión de CTLA-4 durante la respuesta anti- tumoral es capaz de impedir la eliminación de las células tumorales inhibiendo la actividad efectora de los linfocitos T y desencadenando mecanismos contra-reguladores dependientes de células Treg.



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, que permite la activación de los linfocitos T. PD-1 posee dos ligandos, PD-L1 (ligando 1 de muerte programada), que se expresa en varios tipos celulares, incluyendo células inmunes, epiteliales y endoteliales, y PD-L2 (ligando 2 de muerte programada), expresado predominantemente en células presentadoras de antígenos (Sharma y Allison, 2015). Adicionalmente, se ha identificado la expresión de PD-L1 en varios tipos de células tumorales, lo cual se correlaciona con un peor pronóstico (Hino et al., 2010; Zou y Chen, 2008), indicando que este mecanismo es relevante para el escape de las células tumorales durante la respuesta anti-tumoral.

Debido al rol de estas moléculas en la inhibición de las respuestas inmunológicas, y particularmente su funcionalidad en el cáncer, 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; estas terapias son las denominadas bloqueadoras de puntos de control inmunológico (ICBs).

En este sentido, el bloqueo de CTLA-4, PD-1 y PD-L1 en pacientes con diferentes tipos de cáncer, utilizando anticuerpos monoclonales, ha dado resultados muy positivos (Pardoll, 2012). En este sentido, la FDA (administración de alimentos y medicamentos de EE:UU) 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 también para pacientes con cáncer de pulmón avanzado o metastásico (Sharma y Allison, 2015). Además, 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

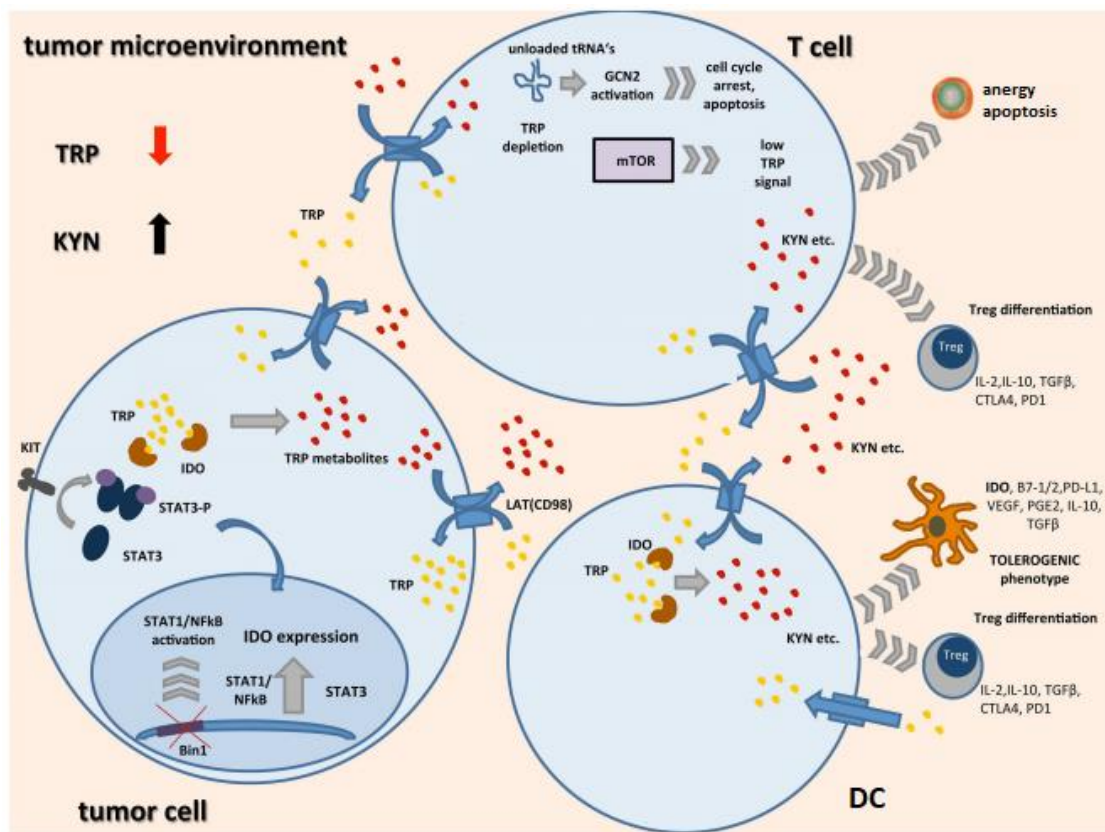
beneficiado por el efecto de dichos anticuerpos, posiblemente por la existencia de diferentes mecanismos de resistencia a estas inmunoterapias (Sharma et al., 2017). Por este motivo, con la finalidad de vencer los diversos mecanismos de resistencia, en los últimos años se han comenzado a caracterizar nuevos puntos de control inmunológicos y a analizar su relevancia en el cáncer. En ese sentido, describiré a continuación dos mecanismos de control inmunológico con potencial acción como puntos de control, relevantes en los que respecta a este trabajo.

### 2.3.1 IDO1

Un mecanismo 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) (Figura 3).

En humanos, la expresión de esta enzima se encuentra restringida a ciertos grupos celulares, como las DCs maduras, las células endoteliales de la placenta y el pulmón y en células de la mucosa del tracto genital femenino (Theate et al., 2015). 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). Se ha demostrado que la expresión de IDO1 puede inducirse tras estímulos pro-

inflamatorios, como el IFN $\gamma$  (Chon et al., 1996; Konan y Taylor, 1996), lo cual asegura una retroalimentación negativa en las respuestas inmunológicas.



**Figura 3. 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.*

IDO1 se encuentra frecuentemente expresada en diferentes tipos de tumores humanos, y se ha demostrado en modelos murinos que su expresión impide el rechazo tumoral inmunológico (Theate et al., 2015; Uyttenhove et al., 2003). En gran cantidad de tumores humanos, la expresión de IDO1 se asocia a una menor sobrevida y una reducción de la infiltración de linfocitos T (Brandacher, 2006; Inaba et al., 2009; Ino et al., 2008). Se ha reportado que a nivel tumoral las células T CD8<sup>+</sup>, junto con la producción de IFN $\gamma$ , son necesarias para la inducción de la expresión de IDO1 (Spranger et al., 2014),

representando un mecanismo de retroalimentación negativa durante la respuesta anti-tumoral.

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 $\beta$ , la cual parece promover el aumento en la expresión de dicha enzima en las células tumorales (Hennequart et al., 2017).

A nivel tumoral son varias las poblaciones celulares en las cuales se ha descrito la expresión de IDO1. Las células tumorales se han reportado a lo largo de la literatura como una fuente importante de IDO1 en el microambiente tumoral, y dicha expresión se ha identificado como un factor pronóstico negativo en el cáncer (Meireson et al., 2020). Las células tumorales expresan IDO1 de forma constitutiva, pero también se ha demostrado que su expresión puede ser inducida por el IFN $\gamma$  (Litzenburger et al., 2014; Uyttenhove et al., 2003)

Se ha descrito la expresión de IDO1 en diferentes células del sistema inmunológico, particularmente en las células presentadoras de antígenos (APCs), en varios tipos de cáncer, (Meireson et al., 2020). En este sentido, se ha demostrado que las células

dendríticas (DCs) pueden representar una fuente relevante de IDO1 en el microambiente tumoral. La expresión de IDO1 en este grupo celular se ha reportado en células dendríticas plasmacitoides (pDCs) (Munn, 2004) y células dendríticas convencionales (cDCs); dentro de estas últimas, solo las células dendríticas convencionales de tipo 1 (cDC1) parecen expresar IDO1 de forma funcional (Meireson et al., 2020). La expresión de IDO1 en las DCs es desencadenada por la señalización por IFN $\gamma$ , a la vez que puede ser inducido por la propia expresión de IDO1 en las células tumorales, lo cual representa un bucle de retroalimentación positiva a este mecanismo contra-regulador. (Holtzhausen et al., 2015; Zhao et al., 2018). Las DCs que expresan IDO1 presentan un fenotipo tolerogénico, que ocasiona la supresión de las células T CD8<sup>+</sup> (Sharma et al., 2007), a la vez que favorece la diferenciación y polarización de las células T hacia un fenotipo Treg (Baban et al., 2009; Fallarino et al., 2006); estas últimas a su vez pueden desencadenar un aumento de IDO1 en las DCs a través de la señalización mediada por la interacción CLTA-4-B7 (Fallarino et al., 2003).

Se ha reportado que los macrófagos también pueden actuar como una fuente predominante de IDO1 a nivel tumoral, particularmente en melanoma (Herrera-Rios et al., 2020). En esta población celular, se ha identificado que la expresión de IDO1 a nivel tumoral se restringe a los macrófagos de tipo M2 (Choe et al., 2014), los cuales se asocian con la progresión tumoral en varios tipos de cáncer (Adu-Gyamfi et al., 2019.; Forssell et al., 2007; Herrera et al., 2013; Honkanen et al., 2019; Lan et al., 2013; Tsutsui et al., 2005; H. Zhang et al., 2015). Otra población menos estudiada, en la cual se ha encontrado la expresión de IDO1 a nivel tumoral corresponde a los linfocitos B. Se ha demostrado que la producción de IDO1 por estas células es capaz de regular la proliferación de linfocitos T, a la vez que induce la generación de Treg. La expresión de IDO1 en los linfocitos B se desencadena por la señalización por CTLA-4; en este contexto dichas células si diferencian a células B reguladoras (Nouël et al., 2015).

Por otro lado, también se ha observado la expresión de IDO1 a nivel tumoral en células endoteliales y fibroblastos asociados al tumor, aunque no está clara la relevancia de esta expresión en la progresión tumoral, ni los mecanismos involucrados en el desencadenamiento de la expresión de la enzima (Meirson et al., 2020).

La inhibición de IDO1 en modelos preclínicos confirmó su rol en el desarrollo tumoral, dado que dicha inhibición ha resultado en efectos antitumorales, sinérgicos con varias inmunoterapias (Holmgaard et al., 2013; Koblisch et al., 2010; Uyttenhove et al., 2003). En este sentido, se han desarrollado varios inhibidores de IDO1 que se encuentran actualmente en evaluación a nivel pre-clínico y clínico (Platten et al., 2019). Dentro de estos inhibidores, uno de los más investigados a nivel preclínico es el Indoximod, el cual corresponde al compuesto 1-metil-triptófano (1-MT) (Prendergast et al., 2018). Este compuesto administrado en monoterapia presenta un leve efecto anti-tumoral, sin embargo, al combinarse con agentes quimioterapéuticos o con inmunoterapias de bloqueo de puntos de control con anti-CTLA-4 y anti-PD-1 demostró una fuerte inhibición tumoral, aumentando los efectos de dichas terapias (Holmgaard et al., 2013; Muller et al., 2005); estos resultados demuestran la importancia de este mecanismo contra-regulador durante la respuesta anti-tumoral mediada por diferentes terapias.

El mecanismo de acción mejor descrito para el 1-MT se basa en la capacidad del mismo de funcionar como un análogo del triptófano. Esto permite la recuperación de las funciones inhibidas por la ausencia de dicho aminoácido, rescatando así la capacidad proliferativa de las células T y, por tanto, su potencial efecto anti-tumoral. Este fenómeno está dado porque el 1-MT es capaz de liberar la supresión de la molécula mTORC1 (Metz et al., 2012), la cual es inhibida en ausencia de triptófano, y juega un rol fundamental en la activación del crecimiento celular, incluyendo el de las células T.

### 2.3.2 TMEM176B

Un punto de control inmunológico emergente es la proteína TMEM176B, también conocida como TORID (TOLernace Related and InduceD). TMEM176B forma parte de la familia de proteínas transmembrana MS4A. Esta molécula fue relacionada a la tolerancia inmunológica, ya que se evidenció un aumento de los niveles del ARNm de *Tmem176b* en trasplantes tolerados (Louvet et al., 2005). Nuestro grupo describió por primera vez su función como un canal iónico en la membrana de fagosomas. Esto le permite a TMEM176B 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. 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).

Luego de constatar la asociación de TMEM176B a la tolerancia inmunológica en el contexto del trasplante (Louvet et al., 2005), se demostró que dicha proteína es esencial para la generación de células Treg CD8<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> 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 tomados en conjunto indicarían que TMEM176B 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 salvajes (WT) en dos modelos de tumor trasplantable (Segovia-Russo et al., 2019; Anexo 2).

Al analizar los mecanismos involucrados en este fenómeno, identificamos un aumento en la activación del inflamasoma NLRP3 *in vivo* en los ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> respecto a ratones WT; esta activación diferencial del inflamasoma podría explicar las diferencias en la supervivencia de ambos grupos. Adicionalmente, demostramos que los ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> presentan un aumento significativo en el infiltrado de las células T CD8<sup>+</sup> totales y específicas del tumor (Segovia-Russo et al., 2019; Anexo 2).

Por otro lado, en nuestro equipo demostramos que la protección frente al crecimiento tumoral es dependiente de la activación del inflamasoma, ya que la respuesta anti-tumoral de los ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> se pierde en ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup>*Caspasa1*<sup>-/-</sup> y en un contexto de bloqueo de IL-1 $\beta$ . Esta protección tampoco se observa en animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> depletados de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Segovia-Russo et al., 2019; Anexo 2) indicando que estas células son fundamentales para la respuesta anti-tumoral observada.

Mediante un screening *in vitro*, donde estudiamos 80 moléculas conocidas por modular la actividad de diferentes canales iónicos, identificamos a la molécula BayK8644 como un potente inhibidor de TMEM176B; BayK8644 es conocido por modular la actividad de canales de Ca<sup>2+</sup> voltaje dependientes tipo L. BayK8644 induce la secreción de IL-1 $\beta$  en ratones WT, y es capaz de dar lugar a un rechazo tumoral similar al observado en animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup>, de una manera dependiente de TMEM176B, caspasa 1/11 y



células T CD8<sup>+</sup> (Segovia-Russo et al., 2019; Anexo 2). Esto fenocopia los mecanismos inmunológicos por los que los tumores son rechazados en los ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> en ausencia de cualquier tratamiento.

Por otra parte, observamos que la depleción de *Tmem176b* o su inhibición farmacológica mediante BayK8644, mejora el efecto anti-tumoral durante el tratamiento con anti-CTLA-4 y anti-PD-1. Estos tratamientos pierden totalmente su eficacia anti-tumoral cuando se inyectan en ratones *Nlrp3*<sup>-/-</sup> y *Caspasa1/11*<sup>-/-</sup>, sugiriendo que el inflamasoma NLRP3 podría jugar un papel importante en la inmunidad anti-tumoral desencadenada por el bloqueo de puntos de control (Segovia-Russo et al., 2019; Anexo 2).

Adicionalmente, evidenciamos que la deficiencia en *Tmem176b* induce un aumento en las células Th17 CD4<sup>+</sup>RORγt<sup>+</sup> en el ganglio linfático drenante del tumor, y el rechazo tumoral mediado por IL-17 (Segovia-Russo et al., 2019; Anexo 2), citoquina, que como se mencionó anteriormente, es mayoritariamente secretada por estas células. En este sentido, se ha demostrado que la IL-1β, principal citoquina producida durante la activación del inflamasoma, junto con la IL-6 y la IL-23 lleva a la diferenciación de células Th17 productoras de IL-17, las cuales poseen roles inflamatorios, con potencial acción anti-tumoral (Deng et al., 2019).

Por otro lado, estudios realizados en mi tesina de grado revelaron que los ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> presentan una mayor expresión y actividad de IDO1 a nivel tumoral, pero no así a nivel del ganglio linfático (Anexo 1, Figura S3 y S4). Como se mencionó anteriormente, esta enzima es inducida por estímulos inflamatorios, y la IL-1β podría tener un rol en dicha inducción en las células tumorales. Esto podría ser un indicio de que IDO1 es un mecanismo contra-regulador relevante, desencadenado a nivel tumoral, durante la sobre-activación del inflamasoma dada por la inhibición de TMEM176B.

## HIPÓTESIS GENERAL

---

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados hasta aquí, nos planteamos la hipótesis de que *la sobre-activación del inflamasoma, dada por la inhibición de TMEM176B, generaría una respuesta anti-tumoral a través de la activación de linfocitos Th17, pero concomitantemente podrían existir mecanismos contra-reguladores mediados por IDO1 a nivel tumoral que disminuirían este efecto.*

## OBJETIVOS

---

### Objetivos generales:

Para investigar la hipótesis de trabajo anteriormente mencionada nos propusimos como objetivos, por un lado, *evaluar el rol de la IL-17 durante las terapias anti-tumorales basadas en la sobre-activación del inflamasoma y el bloqueo de puntos de control inmunológico*, y por otro, *estudiar mecanismos contra-reguladores mediados por IDO1 durante la respuesta anti-tumoral generada por la sobre-activación del inflamasoma en un modelo murino*

### Objetivos específicos:

*Parte 1: Rol de la IL-17 durante la respuesta anti-tumoral mediada por la sobre-activación del inflamasoma y el bloqueo de puntos de control inmunológico.*

- Evaluar el efecto anti-tumoral de la IL-17:
  - Durante la deshinibición del inflamasoma dada por el bloqueo farmacológico de TMEM176B con el compuesto BayK8644.
  - Durante el tratamiento con un bloqueador de punto de control inmunológico dirigido contra PD-1.
  - En un contexto de deshinibición del inflamasoma por el tratamiento con BayK8644 en combinación a la terapia con el anti-PD-1.

## ***Parte 2: Mecanismos contra-reguladores mediados por IDO1 desencadenados por la sobre-activación del inflamasoma***

### ***2.1 Estudiar el rol de IDO1 en un contexto de sobre-activación del inflamasoma dada por la delección génica de Tmem176b:***

- Analizar la contribución de las diferentes poblaciones celulares en el microambiente tumoral a la expresión de IDO1 a nivel tumoral.
- Evaluar la relevancia de la expresión de IDO1 a nivel de la célula tumoral en el desencadenamiento de este mecanismo contra-regulador a nivel tumoral.

### ***2.2 Estudiar el rol de IDO1 en un contexto de sobre-activación del inflamasoma dada por el bloqueo farmacológico de TMEM176B con el compuesto BayK8644:***

- Analizar la expresión y actividad de IDO1 en los tumores de animales tratados con BayK8644.
- Analizar la contribución de las diferentes poblaciones celulares en el microambiente tumoral a la expresión de IDO1 a nivel tumoral.
- Evaluar el rol de las células T CD8<sup>+</sup> en el desencadenamiento de la expresión de IDO1 a nivel tumoral.
- Estudiar el efecto anti-tumoral de la inhibición de IDO1 con el compuesto 1-MT en combinación al tratamiento con BayK8644.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### Cultivo de líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares de origen murino EG7-OVA (linfoma tímico), 5555 (melanoma) y B16-F10 (melanoma). La línea celular EG7-OVA se cultivó en medio DMEM suplementado con 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 estreptomina, 0.05mM  $\beta$ -mercaptoetanol y 0.4 mg/mL de geneticina. Las líneas celulares 5555 y B16-F10 se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino, 100U/mL penicilina y 0.1mg/mL estreptomina.

Todas las líneas celulares se mantuvieron en estufa a 37°C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>.

### Modelos tumorales y tratamientos

Se utilizaron ratones C57BL/6, *Il-17a*<sup>-/-</sup>, *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y *Tmem176b*<sup>+/+</sup> (*littermate* de *Tmem176b*<sup>-/-</sup>), machos y hembras, de 6 a 12 semanas de edad, para los diferentes experimentos especificados. Para los animales *Il-17a*<sup>-/-</sup>, el control salvaje (WT) corresponde a animales C57BL/6, mientras que para los *Tmem176b*<sup>-/-</sup>, se utilizaron ratones *Tmem176b*<sup>+/+</sup> como grupo WT.

Para el modelo de cáncer trasplantable se inyectaron por vía subcutánea (s.c) 5 x 10<sup>5</sup> células EG7-OVA, 5 x 10<sup>4</sup> células 5555 o 2.5 x 10<sup>5</sup> células B16-F10. El número de células utilizado para cada línea celular fue puesto a punto previamente, de forma que el crecimiento de los distintos tumores desarrollados se diera de forma similar a lo largo de los experimentos.

Para el tratamiento con el inhibidor farmacológico de TMEM176B, BayK8644, los animales especificados en cada experimento fueron administrados a partir del día 3 post-inyección de las células tumorales, con 1mg/kg de BayK8644 o Vehículo (etanol 100%), de forma intraperitoneal (i.p.), diariamente y hasta el día 14. El tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-PD-1 se administró en una dosis de 250 µg/ratón de forma i.p los días 6, 9 y 12 post-inyección de las células tumorales. Para el tratamiento combinado de anti-PD-1 y BayK8644, el primero se administró como se describió previamente, mientras que el BayK8644 fue administrado vía i.p. a partir del día 9 post-inyección de las células tumorales, y diariamente hasta el día 20, a una dosis de 1mg/kg.

En el caso del tratamiento con BayK8644 y 1-Metil-Triptófano (1-MT), el BayK8644 o Vehículo fue administrado vía i.p en una dosis de 1mg/kg diariamente, desde el día 3 al día 14 post-inyección de las células tumorales; el 1-MT fue suministrado en el agua de bebida de los ratones a una concentración de 4mg/mL desde el día 3 hasta el día 17 post-inyección. El agua fue preparada cada 3 días, suplementada con aspartamo para ser mejor tolerada por lo animales, y su pH fue ajustado a 7.4; como control se utilizó agua con el vehículo (hidróxido de sodio 1N) suplementada con aspartamo, a la cual también se le ajustó en pH a 7.4. Se monitoreó cada 2 días que los animales tuvieran suficiente agua de bebida, y se verificó que no hubiera un rechazo hacia el agua preparada con el 1-MT.

Para la depleción de linfocitos T CD8<sup>+</sup> los ratones fueron inyectados vía i.p. con 100µg/ratón del anticuerpo anti-CD8, YTS 169.4, a partir del día 3 post-inyección de las células tumorales, y cada 3 días hasta el día de finalización del experimento. Este tratamiento se combinó con la administración i.p de 1mg/kg de BayK8644 o Vehículo, desde el día 3 hasta el día 14 post-inyección.

Para realizar los análisis de los tumores mediante RT-qPCR, Western Blot, citometría de flujo y ensayo de producción de quinurenina, los ratones se sacrificaron por dislocación

cervical al día 14 post- inyección, y se resecó el tumor y/o el bazo, según el experimento a realizar.

Para los experimentos de evaluación de progresión tumoral, se monitoreó el tamaño tumoral utilizando un calibre, cada 2 días, durante un tiempo máximo de 60 días. El punto final se determinó como el momento en el cual el diámetro mayor tumoral alcanzara un tamaño de 20mm.

### RT-PCR cuantitativa

Se realizó la técnica de RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR) para evaluar la expresión de *Ido1* e *Ido2* en los tumores de los diferentes grupos de ratones utilizados.

Para esto se usaron los cebadores para *Ido1* directo 5'-CAGGCCAGAGCAGCATCTTC-3' y reverso 5'-GCCAGCCTCGTGTTTTATTCC-3', y para *Ido2* directo 5'-CACAGAGCCTCTGAAGTACTC - 3' y reverso 5'- CTAAGCACCCAGGACACAGGA - 3'.

Se evaluó la eficiencia de los cebadores de *Ido1* e *Ido2*, realizando diluciones seriadas al medio de ADNc de tumores de ratones, obtenido durante mi tesis de grado y de hígados de ratones sanos, respectivamente. Mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% se determinó la presencia del amplicón de interés, de 62pb para *Ido1* y de 448pb en el caso de *Ido2* (Anexo 1, Figura 1 y 2).

Como gen normalizador se utilizó *Gapdh* (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), empleando los cebadores directo 5'-CTACAGCAACAGGGTGGTGG-3' y reverso 5'-TATGGGGGTCTGGGATGG-3'. La eficiencia de este set de cebadores se evaluó previamente en nuestro laboratorio.

Se extrajo el ARN mediante la técnica del Trizol-Cloroformo. Para las líneas celulares,  $2 \times 10^6$  células, obtenidas directamente del cultivo celular, fueron incubadas con 1mL de trizol. En el caso de los tumores y los hígados, estos se disgregaron utilizando un Bullet

Blender (Next Advance) y perlas de acero inoxidable de 0.5mm, con 1mL de Trizol, a una potencia de 12, durante 5 minutos. En todos los casos se realizó una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 500µL 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 500 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 50µL de agua ultra pura libre de ARNsas y ADNsas.

El ARN se cuantificó mediante Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) y se evaluó la integridad del mismo mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se realizó la retrotranscripción de 2µg de ARN, utilizando 100 unidades de oligo(dT)s y la transcriptasa reversa SuperScript II, según el protocolo recomendado por el fabricante.

Una vez obtenido el ADNc se llevó a cabo la PCR cuantitativa. Para esto, se sembraron 4µL de ADNc con 6µL de cada mix (*Ido1*, *Ido2*, *Gapdh*) conteniendo 10µM de cebadores, BSA 25mg/mL y SYBR Green Master Mix. A cada experimento se le agregó un calibrador (ADNc de esplenocitos activados con concavalina A en el caso de *Ido1*, o ADNc obtenido de hígados de ratón para *Ido2*), y un control negativo (agua ultra pura libre de ARNsas y ADNsas). Para efectuar el ciclado de la PCR se utilizó el equipo QuantStudio3 (Applied Biosystems). El *annealing* se realizó a 60°C durante 1 minuto, y la amplificación se llevó a cabo en 40 ciclos.

La expresión relativa de *Ido1* e *Ido2* 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  $(Ct_{Ido1 \text{ o } Ido2 \text{ muestra}} - Ct_{Gapdh \text{ muestra}}) - (Ct_{Ido1 \text{ o } Ido2 \text{ calibrador}} - Ct_{Gapdh \text{ calibrador}})$ ,



siendo el 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.

### Western Blot

Se analizó la expresión de IDO1 en tumores mediante Western Blot. Para esto, los tumores se disgregaron y lisaron con un Potter en solución de lisis RIPA (150mM NaCl, 0.25% Deoxicolato de Sodio, 1mM EDTA, 50mM TRIS, 1% NP40) 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 del ácido bicinconinico (BCA), se diluyeron en buffer de carga ( $\beta$ -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.

Se sembraron 50 $\mu$ g de proteína en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE), con una fase concentradora al 5% y una fase separadora al 8%. La corrida electroforética se realizó a 150V hasta perder el frente de corrida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por electro-transferencia 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 1 $\mu$ g/mL del anticuerpo monoclonal de rata anti-IDO1 de ratón (clon m-IDO48), 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 1 $\mu$ g/mL del anticuerpo de ratón anti-rata conjugado a biotina, diluido en TBS-Tween 0.1%- Leche 1%. A este paso le siguieron 4 lavados con TBS-

Tween 0.1%. Se realizó una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente con 1µg/mL de estreptavidina conjugada a HRP, 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.

Para la normalización de la expresión de IDO1 se utilizó la proteína de expresión constitutiva GAPDH. Para esto, luego del revelado del Western Blot anti-IDO1, la membrana fue sometida al proceso de *stripping* 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 del anticuerpo de conejo anti-GAPDH, 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 del anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado a HRP, 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. La cuantificación de la expresión de ambas proteínas se hizo mediante densitometría, utilizando el software ImageJ v.1.5. La expresión relativa de IDO1 se calculó a partir de los valores obtenidos, como la relación de la señal IDO1/GAPDH.

### Citometría de flujo

Se realizó citometría de flujo para evaluar la presencia de diferentes poblaciones de interés en suspensiones celulares de tumor y bazo, de los grupos de animales especificados en cada experimento.

Para la obtención de las suspensiones celulares a partir de tumores, estos fueron inyectados con 1mL de colagenasa a una concentración de 1mg/mL y posteriormente

cortados en fragmentos de 1mm. Esto se incubó durante 5 minutos a 37°C, y la reacción se detuvo con 100µL de EDTA 10mM. Los fragmentos de los tumores se filtraron de forma mecánica en PSA (PBS, 0.2% suero fetal bovino, 0.1% azida de sodio) utilizando un filtro de 100µm y el émbolo de una jeringa. La suspensión obtenida se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm, y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se incubó durante 5 minutos con solución de lisis de glóbulos rojos (SLGR; 0.15M NH<sub>4</sub>Cl, 0.01M KHCO<sub>3</sub> y 100µM Na<sub>2</sub>EDTA; pH 7.4), se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm y se descartó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con PBS y se re-suspendió el *pellet* en 1mL de PSA.

Los bazos fueron disgregados de forma mecánica en PSA, utilizando un filtro y el émbolo de una jeringa. La suspensión se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm, se lisaron los glóbulos rojos utilizando SLGR, se lavó 2 veces con PBS y el *pellet* se re-suspendió en 1mL de PSA.

Para evaluar el infiltrado de linfocitos TCD8<sup>+</sup> y la expresión de IDO1 en diferentes poblaciones celulares en tumores, se incubaron 1x10<sup>6</sup> células con 20µL de diferentes *mix* de anticuerpos para el marcado de superficie, diluidos en PSA a una concentración de 1µg/mL. Los anticuerpos utilizados para identificar las diferentes poblaciones celulares fueron los siguientes: anti-TCRVβ12 (células tumorales); anti-TCRβ y anti-CD8<sup>+</sup> (linfocitos T CD8<sup>+</sup>); anti-CD45 (leucocitos); anti-CD45 y anti-B220 (linfocitos B); anti-MHC clase II, anti-CD11c y anti-CD11b (células dendríticas). La incubación se realizó durante 25 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugó 2 minutos a 2200 rpm y se realizaron dos lavados con PSA. Para el marcado intracelular con IDO1, se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) 2% durante 10 minutos, se lavó 2 veces con PBS, y se llevó a cabo la permeabilización con PSA-saponina 0.5% por 20 minutos. Se incubaron las muestras con 20µL del anticuerpo anti-IDO1, a una concentración de 1mg/mL diluido en PSA-saponina 0.1%, 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó 2 veces con PSA y se fijaron las muestras con PFA 2%.

Las diferentes poblaciones celulares se identificaron como se describe a continuación. Células tumorales: TCRV $\beta$ 12<sup>+</sup>; células no tumorales: TCRV $\beta$ 12<sup>-</sup>; linfocitos TCD8<sup>+</sup>: TCRV $\beta$ 12<sup>-</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>; leucocitos: TCRV $\beta$ 12<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>; linfocitos B: TCRV $\beta$ 12<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>; células dendríticas: TCRV $\beta$ 12<sup>-</sup>MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>hi</sup>, dentro de las cuales se definieron las células dendríticas tipo 1 (cDC1) como CD11b<sup>-</sup> y las células dendríticas tipo 2 (cDC2) como CD11b<sup>+</sup>. Utilizando estos marcados, se evaluó el infiltrado de células T CD8<sup>+</sup>, la proporción de células tumorales, células no tumorales, leucocitos, linfocitos B y células dendríticas (totales, cDC1 y cDC2) dentro de las células IDO1<sup>+</sup>, y la expresión de IDO1, de forma global y dentro de dichas poblaciones.

Para determinar la presencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en el bazo, y así evaluar la correcta depleción de los mismos, se incubaron 1x10<sup>6</sup> células con 20 $\mu$ L de un *mix* de anticuerpos de marcado de superficie conteniendo 1 $\mu$ g/mL de los anticuerpos anti-TCR $\beta$  y anti-CD8, diluidos en PSA, durante 25 minutos. Posteriormente se centrifugó 2 minutos a 2200 rpm y se realizaron dos lavados con PSA y se fijaron las células con PFA 2% durante 10 minutos. Los linfocitos TCD8<sup>+</sup> se determinaron como las células TCR $\beta$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>.

La adquisición de las muestras se realizó utilizando los citómetros CyAn™ ADP, BD Accuri™ C6 o BD FACSAria™ Fusion, y el análisis se llevó a cabo con en el software FlowJo v.X.

### **Análisis de producción de quinurenina**

Para determinar la presencia de quinurenina a nivel tumoral se realizó el método del Reactivo de Ehrlich (Takikawa et al., 1988). Para esto, se disgregaron y lisaron los tumores como se explicó anteriormente, obteniéndose la fase acuosa del producto de lisis, el cual se cuantificó por la técnica de BCA. Se agregaron 150 $\mu$ L del lisado a un tubo eppendorf junto a 75 $\mu$ L de ácido tricloroacético 30% frío, se homogeneizó con vortex, y se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Para cada muestra se realizaron

triplicados de este procedimiento, y en todos los casos se usó entre 1mg y 2.5mg de proteína para cada réplica. Este mismo procedimiento se realizó para L-quinurenina comercial, en concentraciones de 0 a 100 $\mu$ M, para generar una curva de calibración. Posteriormente se recuperaron 150 $\mu$ L del sobrenadante, se agregaron a una placa de 96 pocillos y se adicionaron 150 $\mu$ L 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 de las mismas a la curva de calibración, mediante el software GraphPad Prism v.6, y se normalizó el resultado obtenido por la cantidad de proteína presente en cada muestra.

### Análisis estadísticos

Para los análisis estadísticos se utilizó el software GraphPad Prism v.6.

Los análisis de la supervivencia de los diferentes grupos de animales se realizaron mediante el test Log-Rank (Mantel-Cox), con un p-valor de corte de 0.05.

Para evaluar diferencias entre los diferentes grupos analizados en cada uno de los experimentos de RT-qPCR, Western Blot, citometría de flujo y análisis de producción de quinurenina, previamente se determinó la distribución de las muestras, utilizando el test de normalidad D'Agostino-Pearson, y la presencia de *outliers*, por el método de ROUT, con un valor de Q del 1%. Una vez eliminados los *outliers*, en el caso de los grupos con distribución normal, se realizó el test de t, y para los grupos con distribución no normal, o un N menor a 5, se utilizó el test de Mann-Whitney. En ambos casos se definió un p-valor de corte de 0.05.

## RESULTADOS

---

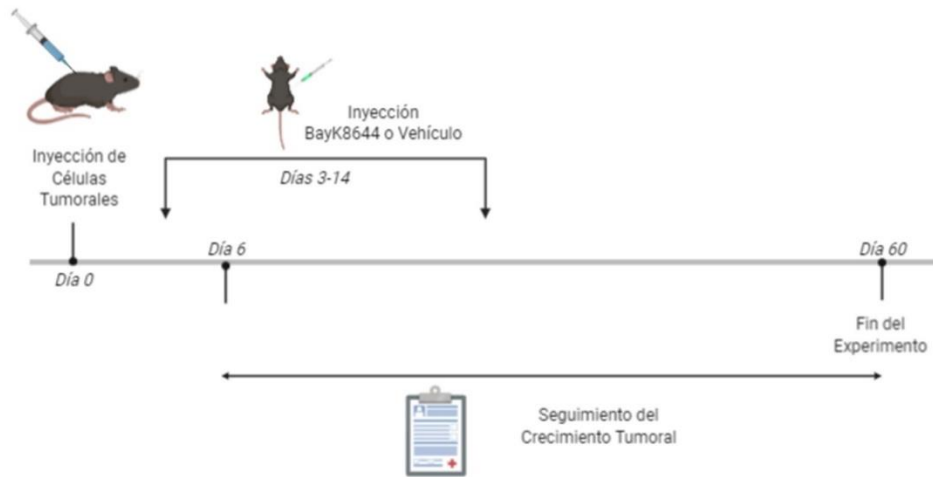
### Parte 1: Rol de la IL-17 durante la respuesta anti-tumoral mediada por la sobre-activación del inflamasoma y el bloqueo de puntos de control inmunológico

Como mencionamos en la introducción, resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que durante la respuesta anti-tumoral, la sobre-activación del inflamasoma dada por la depleción génica de *Tmem176b*<sup>-/-</sup> induce la acumulación de linfocitos Th17 en el ganglio linfático drenante de tumor, y que la IL-17 es necesaria para el rechazo tumoral en ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> (Segovia-Russo et al., 2019; Anexo 2, Figura S2 j y l).

Por otro lado, como se mencionó en la introducción, se ha reportado que la IL-17 sería necesaria para la respuesta anti-tumoral durante el tratamiento utilizando el anticuerpo monoclonal anti-PD1 (Esfahani y Miller, 2017), y la respuesta clínica a este tratamiento se asocia a una alta expresión de IL-17 por linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Krieg et al., 2018).

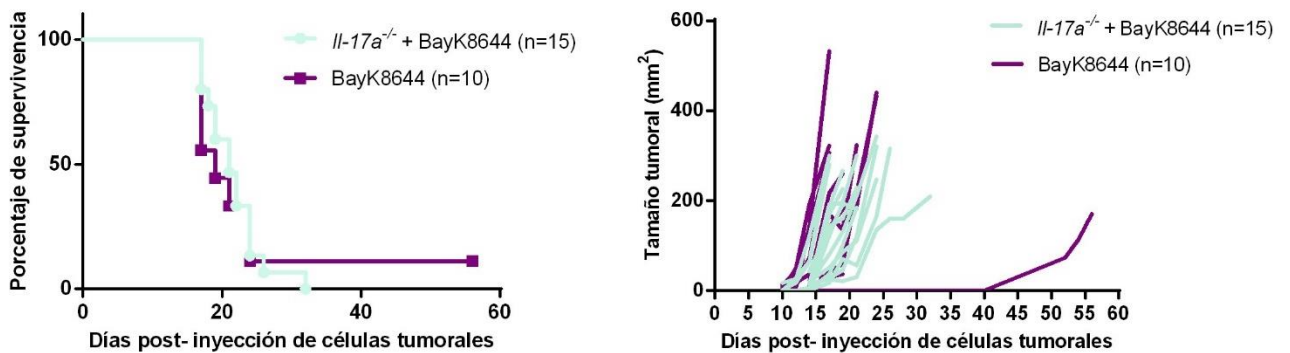
Teniendo en cuenta estos antecedentes, decidimos investigar los efectos de la deleción génica de la *Il-17a* en la acción terapéutica de dos terapias anti-tumorales. Una de ellas es el inhibidor farmacológico de TMEM176B, el Bayk8644, el cual genera una sobre-activación del inflamasoma que fenocopia los efectos de la deleción génica de *Tmem176b* (Segovia-Russo et al., 2019; Anexo 2, Figura 6). La otra terapia evaluada es el anticuerpo monoclonal anti-PD1. Para esto, inyectamos ratones *Il-17a*<sup>-/-</sup> y WT con células tumorales EG7-OVA o 5555, y realizamos los tratamientos y el seguimiento del crecimiento tumoral y la supervivencia de los animales como se muestra en las Figuras 4 a y 5 a.

a)



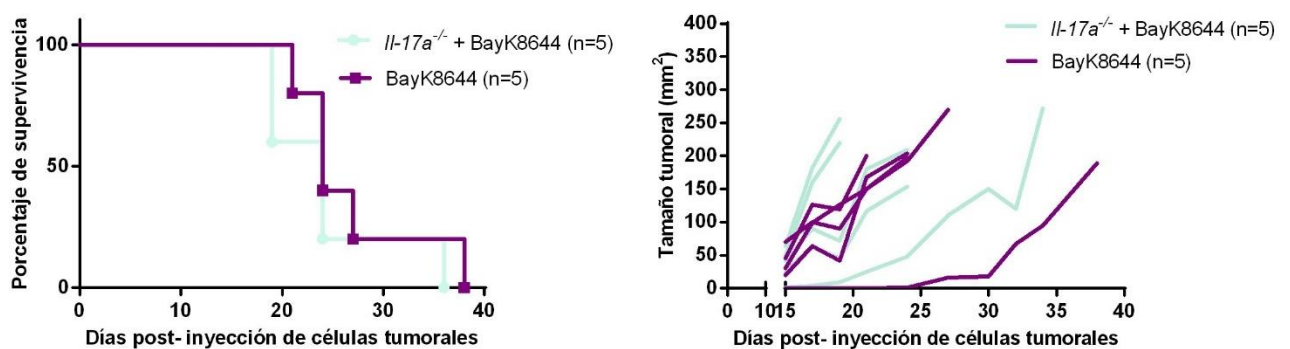
b)

### EG7-OVA



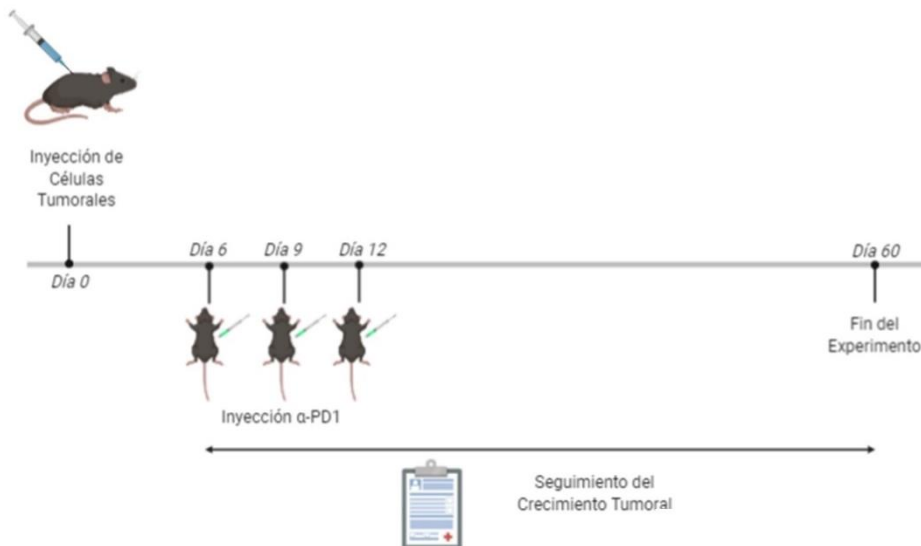
c)

### 5555



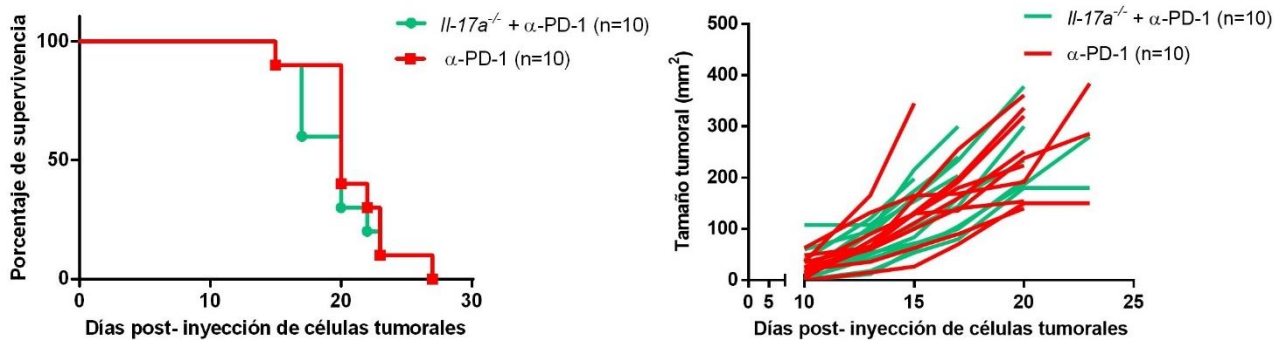
**Figura 4. Rol de la IL-17 durante la sobre-activación farmacológica del inflammasoma con BayK8644.** a) Esquema de inyección y tratamiento realizado en los animales *Il-17a*<sup>-/-</sup> y WT (generado con bioRENDER). b y c) Curva de supervivencia (izquierda) y crecimiento tumoral (derecha) de ratones *Il-17a*<sup>-/-</sup> y WT inoculados con células tumorales EG7-OVA (b) o 5555 (c), y tratados con BayK8644 (1mg/kg) o Vehículo de forma intra-peritoneal, según muestra el esquema. El porcentaje de supervivencia refiere al número de animales que sobrevivieron respecto al total de ratones inyectados.

a)



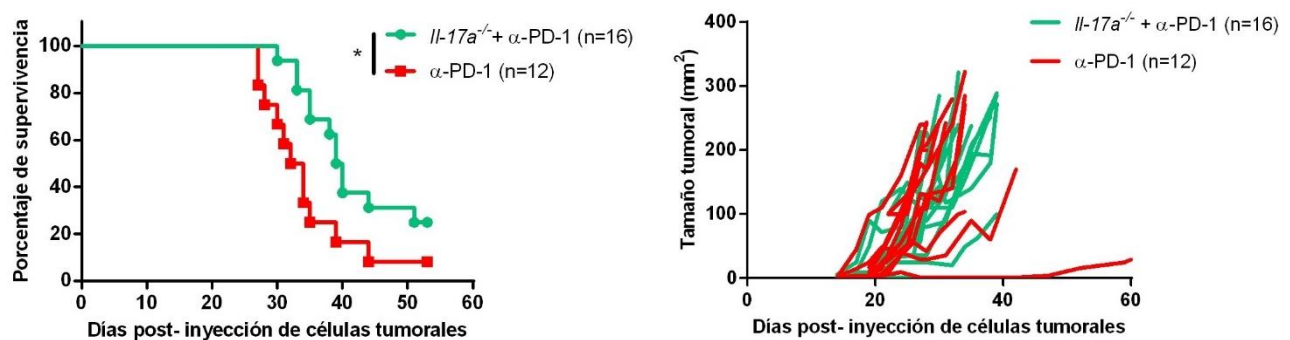
b)

### EG7-OVA



c)

### 5555



**Figura 5. Rol de la IL-17 durante la terapia con anti-PD-1.** a) Esquema de inyección y tratamiento realizado en los animales  $Il-17a^{-/-}$  y WT (generado con bioRENDER). b y c) Curva de supervivencia (izquierda) y crecimiento tumoral (derecha) de ratones  $Il-17a^{-/-}$  y WT inoculados con células tumorales EG7-OVA (b) o 5555 (c), y tratados con anti-PD-1 (250  $\mu$ g/ratón) de forma intraperitoneal, según muestra el esquema. El porcentaje de supervivencia refiere al número de animales que sobrevivieron respecto al total de ratones inyectados. \*: p-valor<0,05.

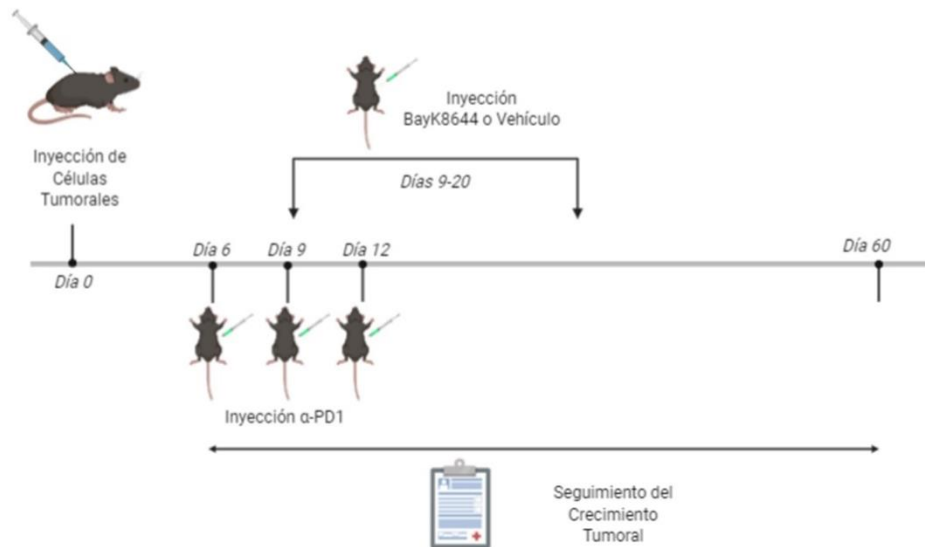


En los experimentos con BayK8644, no observamos diferencias en la sobrevida entre los animales *Il-17a<sup>-/-</sup>* y WT, para ninguna de las líneas tumorales utilizadas (Figuras 4 b y c). En lo referente al tratamiento con anti-PD-1, observamos que en la línea tumoral EG7-OVA dicho tratamiento parece no tener efecto, ya que no es capaz de extender la sobrevida ni evitar el crecimiento tumoral de los animales en este modelo (Figura 5 b). En contraste, en la línea 5555 el tratamiento con anti-PD-1 parecería tener un efecto beneficioso, tanto en la sobrevida como en el desarrollo tumoral de los animales, pero, inesperadamente, los animales con la delección génica de *Il-17a* parecen responder mejor a la terapia que los WT, presentando una sobrevida significativamente mayor (Figura 5 c; p-valor=0,029).

Dado que resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que el tratamiento con anti-PD-1 se ve potenciado por la administración de BayK8644 (Segovia-Russo et al., 2019; Anexo 2, Fig 6 l-o), decidimos también evaluar el rol de la IL-17 en el tratamiento combinado con ambos fármacos. En este caso, los animales *Il-17a<sup>-/-</sup>* y WT fueron inyectados con células 5555 y luego administrados con BayK8644 y anti-PD-1 como se muestra en la Figura 6 a. Cabe destacar que se usó únicamente la línea derivada de melanoma 5555, porque la línea EG7-OVA parece no responder al tratamiento con anti-PD-1 en este modelo. Adicionalmente, la elección de esta línea celular se respalda en el hecho de que se ha reportado un rol de IL-17 en el tratamiento con anti-PD-1 en pacientes con melanoma, lo cual a su vez hemos identificado en análisis bioinformáticos generados en nuestro laboratorio (resultados no publicados).

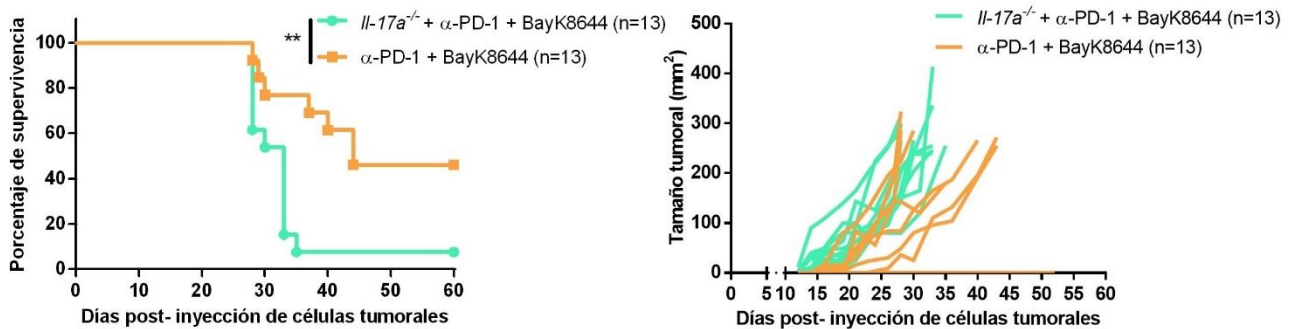
En este modelo, observamos que los animales *Il-17a<sup>-/-</sup>* responden peor al doble tratamiento con anti-PD-1 y BayK8644 que los WT, siendo que los animales WT presentan una sobrevida significativamente mayor (Figura 6 b; p-valor=0,0048). Este resultado muestra una relación inversa en la sobrevida de los animales respecto al tratamiento en monoterapia con anti-PD-1 (Figura 5 c).

a)



b)

**5555**



**Figura 6. Rol de la IL-17 durante el doble tratamiento con anti-PD-1 y BayK8644.** a) Esquema de inyección y tratamiento realizado en los animales *Il-17a<sup>-/-</sup>* y WT (generado con bioRENDER). b) Curva de supervivencia (izquierda) y crecimiento tumoral (derecha) de ratones *Il-17a<sup>-/-</sup>* y WT inoculados con células tumorales 5555, y tratados con anti-PD-1 (250  $\mu$ g/ratón) y BayK8644 (1mg/kg) de forma intra-peritoneal, según muestra el esquema. El porcentaje de supervivencia refiere al número de animales que sobrevivieron respecto al total de ratones inyectados. \*\*: p-valor<0,01.

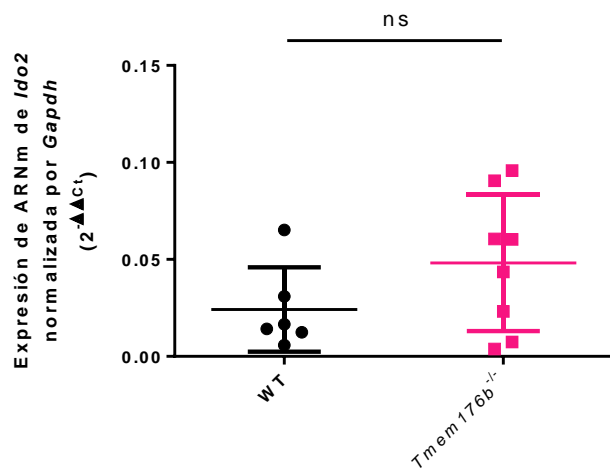
## Parte 2: Mecanismos contra-reguladores mediados por IDO1 desencadenados por la sobre-activación del inflammasoma

### 2.1 Expresión de IDO1 en tumores de animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y WT

Como mencionamos en la introducción, la presencia de mecanismos inmunológicos efectores es capaz de desencadenar mecanismos contra-reguladores, dentro de los cuales se encuentra la enzima IDO1. Durante el desarrollo de mi tesina de grado demostramos que en tumores EG7-OVA de ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> existe una mayor expresión de ARNm de *Ido1*, y un aumento en la presencia de quinurenina, metabolito generado durante la acción de esta enzima, respecto a ratones WT (Anexo 1, Figura S3). Sin embargo, no observamos esta diferencia a nivel de los ganglios linfáticos drenantes de tumor (Anexo 1, Figura S4).

Para ahondar en estos resultados, en primer lugar, decidimos evaluar la expresión de IDO2, otra enzima capaz de degradar el triptófano por la vía de la quinurenina a nivel tumoral (Metz et al., 2007). Al igual que IDO1, IDO2 ha sido implicada en la inmunorregulación, sin embargo, esta última presenta un patrón de expresión más restringido, siendo que se expresa únicamente en células presentadoras de antígeno, el hígado, riñón, cerebro y placenta (Prendergast et al., 2014). Recientemente, se ha demostrado que la expresión de IDO2 se encuentra aumentada en algunos tipos de tumores, y que dicha expresión se encuentra relacionada a la progresión tumoral (P. Li et al., 2021).

Estos experimentos se realizaron para determinar si IDO2 juega un rol en el aumento de quinurenina observado en animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup>. Para esto, analizamos mediante RT-qPCR la expresión de ARNm *Ido2* en tumores de animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y WT.

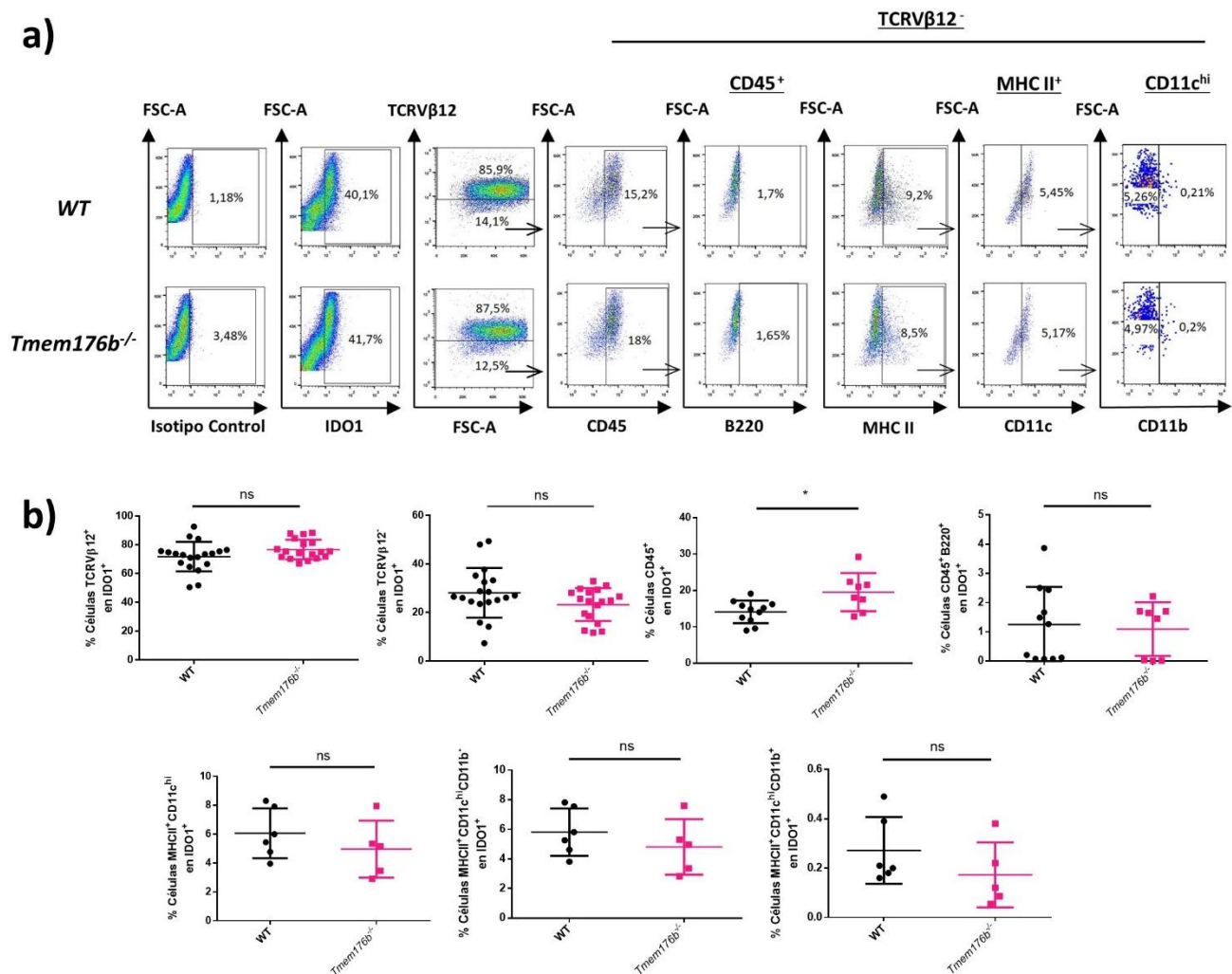


**Figura 7. Expresión de ARNm de *Ido2* en tumores EG7-OVA de ratones WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> analizada por RT-PCR cuantitativa.** Expresión de ARNm de *Ido2* normalizada por *Gapdh* (2<sup>-ΔΔCt</sup>), en tumores de animales WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> inoculados con células EG7-OVA. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes. ns (no significativo): p-valor>0,05.

En este análisis, no observamos una diferencia en los niveles de expresión del ARNm *Ido2* (Figura 7), de forma que es probable que sea IDO1 la principal enzima responsable en generar el aumento en la producción de quinurenina en los ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup>.

### 2.1.1 Las células tumorales son las principales contribuyentes a la expresión aumentada de IDO1 en los animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup>

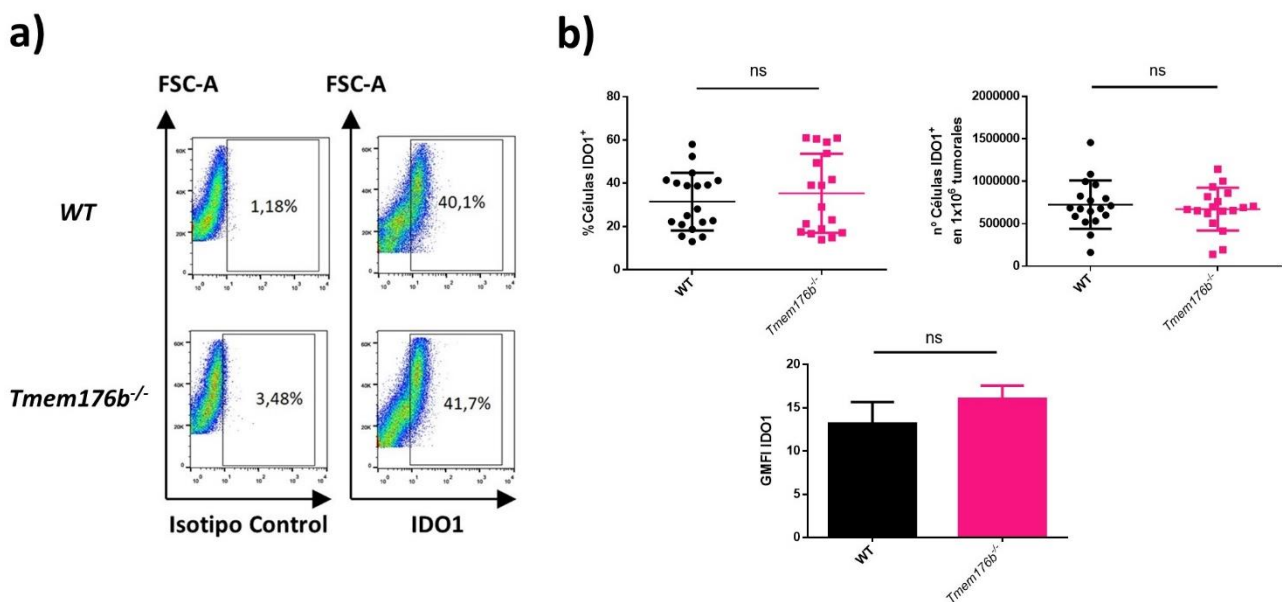
Como se mencionó previamente, a nivel del microambiente tumoral existen diferentes poblaciones celulares capaces de expresar IDO1, dentro las cuales se encuentran las células tumorales y diferentes células inmunológicas infiltrantes (Meierson et al., 2020). Un punto interesante a analizar en nuestro modelo radica en determinar las poblaciones celulares que dan lugar a la producción aumentada de IDO1 en los tumores de animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup>. Para esto, mediante citometría de flujo de tumores, generados a partir de la línea celular EG7-OVA, de animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y WT, evaluamos dentro de las células IDO1 positivas la proporción de diferentes poblaciones celulares relevantes en el microambiente tumoral para las cuales se ha descrito la expresión de IDO1, y por otro lado examinamos diferencias en la expresión de IDO1 entre ambos grupos de animales, a nivel global y dentro de las diferentes poblaciones celulares analizadas.



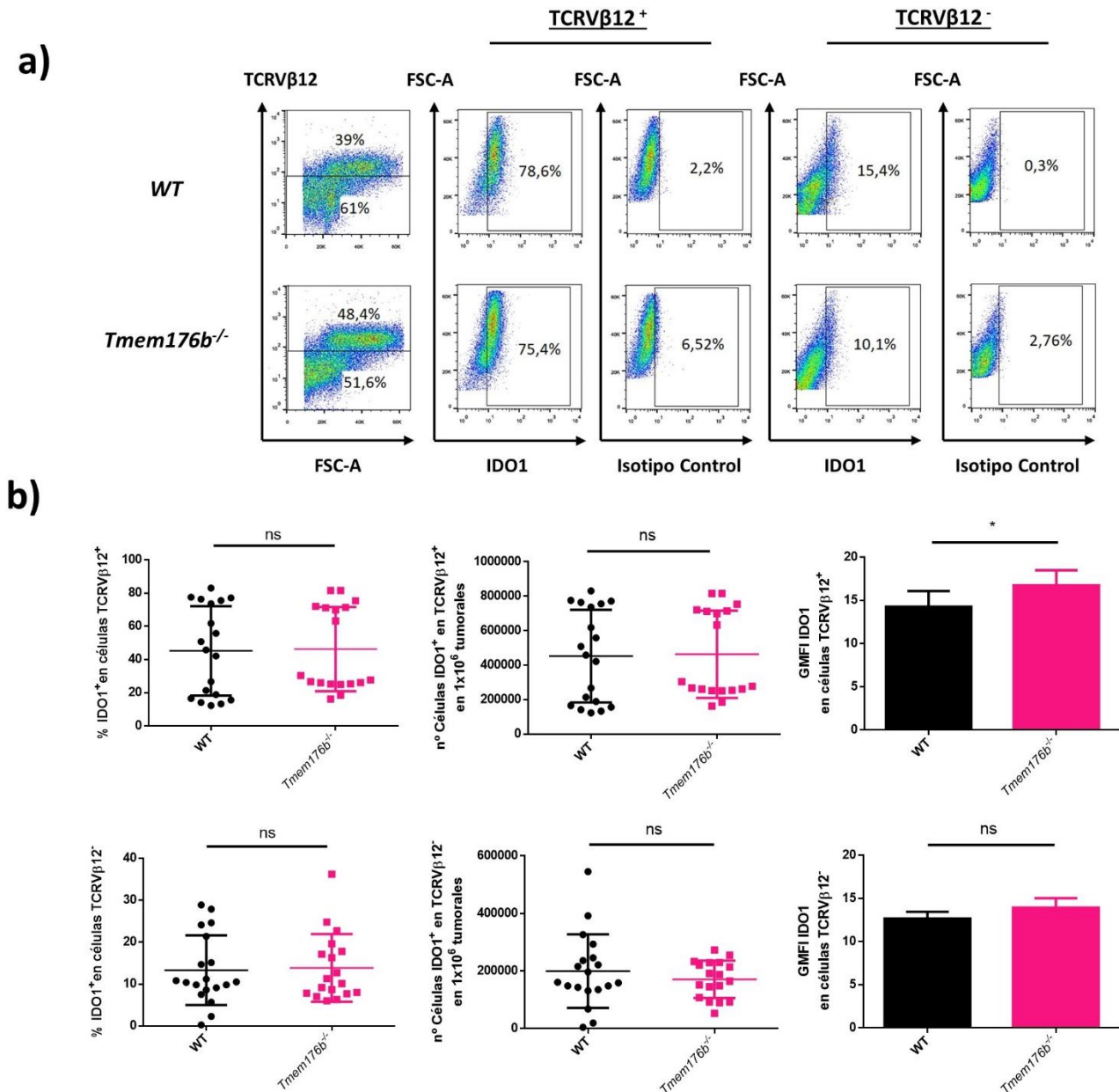
**Figura 8. Proporción de diferentes poblaciones celulares dentro de las células IDO1 positivas en tumores EG7-OVA de ratones WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup>.** a) Estrategia de *gating* utilizada. Se muestra el marcado obtenido para el anticuerpo del control isotípico (Isotipo Control); este fue restado al marcado de IDO1 para cada muestra. b) Porcentaje de las diferentes poblaciones celulares analizadas dentro de las células IDO1 positivas en tumores de animales WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> inoculados con células EG7-OVA. Las poblaciones se definieron como se describe a continuación. Células tumorales: TCRVβ12<sup>+</sup>; células no tumorales: TCRVβ12<sup>-</sup>; leucocitos: TCRVβ12<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>; linfocitos B: TCRVβ12<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>; células dendríticas: TCRVβ12<sup>-</sup>MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>hi</sup>, dentro de las cuáles las células dendríticas clase 1 (cDC1) se definen como CD11b<sup>-</sup> y las células dendríticas clase 2 (cDC2) como CD11b<sup>+</sup>. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes. ns (no significativo): p-valor>0,05; \*: p-valor<0,05.

En estos experimentos, observamos que la población mayoritaria dentro de las células IDO1 positivas corresponde a las células tumorales (TCRVβ12<sup>+</sup>), las cuales representan aproximadamente un 75% en ambos grupos de animales (media WT: 71,9±2,3; media *Tmem176b*<sup>-/-</sup>: 76,8±1,6) no presentándose diferencias entre ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y WT. Dentro de las células no tumorales (TCRVβ12<sup>-</sup>; correspondientes a aproximadamente un

25% de las células que expresan IDO1), un 17% aproximadamente de las células IDO1 positivas corresponde a leucocitos (CD45<sup>+</sup>) (media WT: 14±0,9; media *Tmem176b*<sup>-/-</sup>: 19,5±1,8), siendo que los animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> presentan un porcentaje significativamente mayor de estas células que los WT (p-valor=0,011). A su vez, aproximadamente un 1% de las células corresponden a linfocitos B (CD45<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>) (media WT: 1,2±0,4; media *Tmem176b*<sup>-/-</sup>: 1,1±0,3) y un 5,5% a células dendríticas (MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>hi</sup>) (media WT: 6±0,7; media *Tmem176b*<sup>-/-</sup>: 4,9±0,9), dentro de las cuales 5,3% corresponde a células dendríticas clase 1 (cDC1: MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>hi</sup>CD11b<sup>-</sup>) (media WT: 5,8±0,6; media *Tmem176b*<sup>-/-</sup>: 4,8±0,8) y 0,2% a células dendríticas clase 2 (cDC2: MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>hi</sup>CD11b<sup>+</sup>) (media WT: 0,3±0,05; media *Tmem176b*<sup>-/-</sup>: 0,17±0,06) (Figura 8); en ninguna de estas poblaciones infiltrantes existen diferencias entre animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y WT.

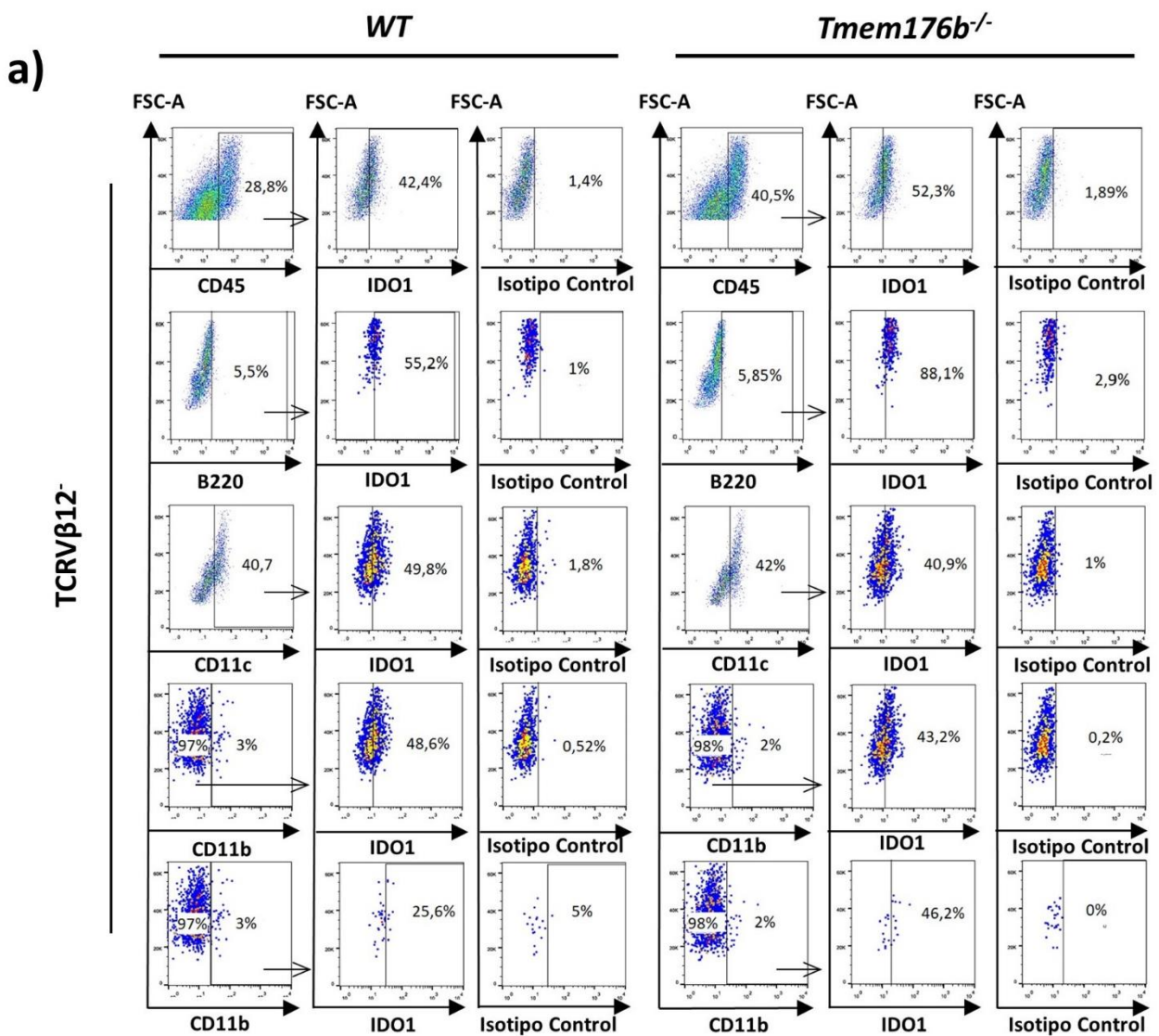


**Figura 9. Expresión de IDO1 a nivel global en tumores EG7-OVA de ratones WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup>.** a) Estrategia de *gating* utilizada. Se muestra el marcado obtenido para el anticuerpo del control isotípico (Isotipo Control); este fue restado al marcado de IDO1 para cada muestra. b) Porcentaje (izquierda), número absoluto (medio) e intensidad de fluorescencia media (derecha) de células IDO1 positivas a nivel tumoral en animales WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> inoculados con células EG7-OVA. El número absoluto fue normalizado por el número de células tumorales presente en cada tumor; se muestra el número de células IDO1 en 1x10<sup>6</sup> células tumorales. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes. ns (no significativo): p-valor>0,05.



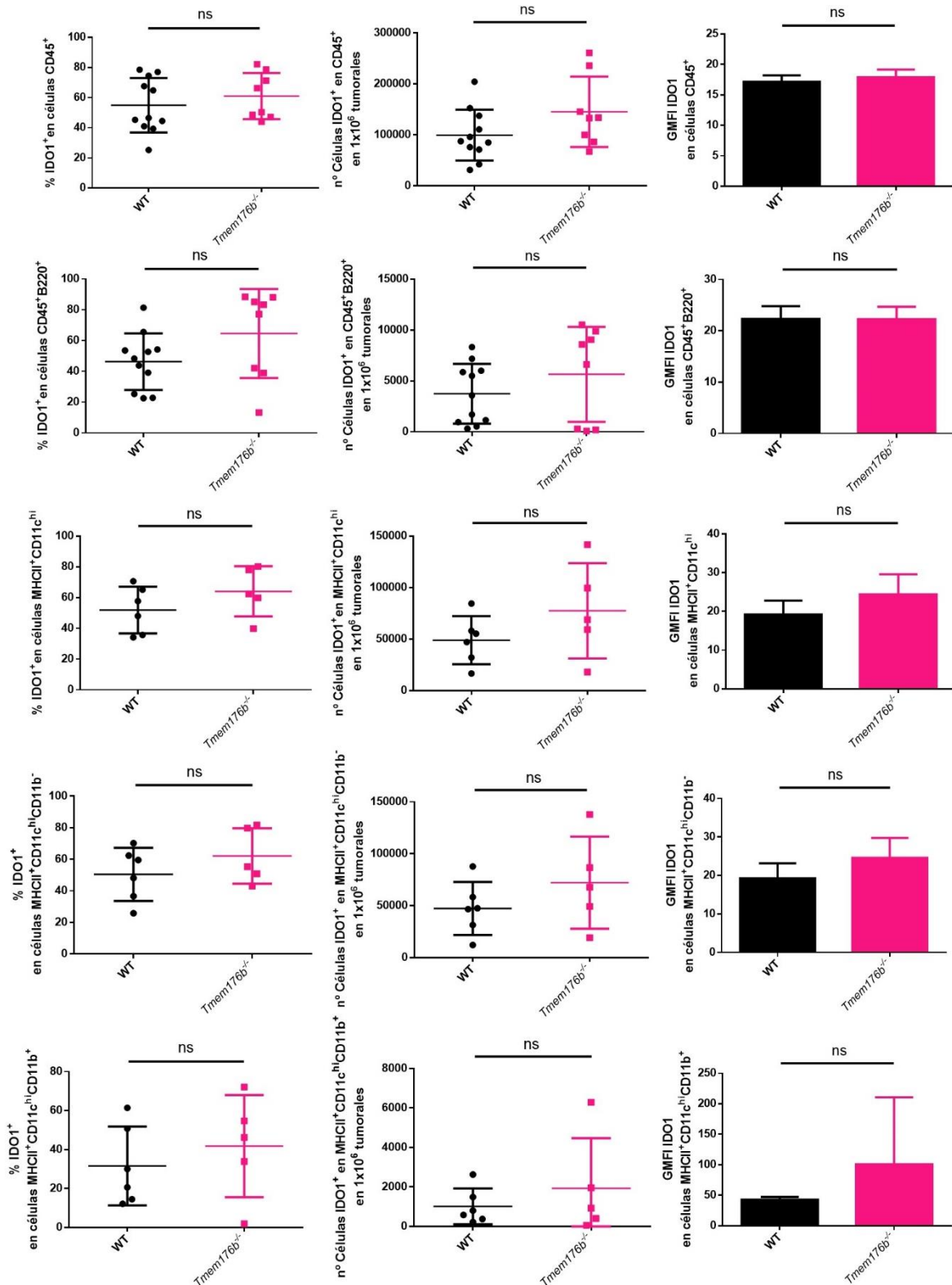
**Figura 10. Expresión de IDO1 en células tumorales y no tumorales de ratones WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup>.** a) Estrategia de *gating* utilizada. Se muestra el marcado obtenido para el anticuerpo del control isotípico (Isotipo Control) en ambas poblaciones celulares; este fue restado al marcado de IDO1 para cada muestra. b) Porcentaje (izquierda), número absoluto (medio) e intensidad de fluorescencia media (derecha) de células IDO1 positivas en células tumorales (TCRVβ12<sup>+</sup>; arriba) y no tumorales (TCRVβ12<sup>-</sup>; abajo) de animales WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> inoculados con células EG7-OVA. El número absoluto fue normalizado por el número de células tumorales presente en cada tumor; se muestra el número de células IDO1 en 1x10<sup>6</sup> células tumorales. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes. ns (no significativo): p-valor>0,05. \*: p-valor<0,05.

Al evaluar la expresión de IDO1 a nivel global no observamos diferencias entre animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y WT (Figura 9). Sin embargo, en el análisis de la expresión de IDO1 dentro de las diferentes poblaciones celulares anteriormente mencionadas, evidenciamos una diferencia significativa entre ambos grupos de animales únicamente en la población correspondiente a las células tumorales (Figura 10 b y 11 b). En dicha población, observamos una intensidad de fluorescencia de IDO1 significativamente mayor en los tumores de animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> en comparación a los WT (p-valor=0,046), pero no detectamos diferencias en el porcentaje o número absoluto de células tumorales que expresan IDO1 entre ambos grupos de animales (Figura 10 b).





b)



**Figura 11. Expresión de IDO1 en diferentes poblaciones infiltrantes en tumores de ratones WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup>.** a) Estrategia de *gating* utilizada. Se muestra el marcado obtenido para el anticuerpo del control isotípico (Isotipo Control) en las diferentes poblaciones celulares; este fue restado al marcado de IDO1 para cada muestra. b) Porcentaje (izquierda), número absoluto (medio) e intensidad de fluorescencia media (derecha) de células IDO1 positivas en leucocitos (CD45<sup>+</sup>), linfocitos B (CD45<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>) y células dendríticas (MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>hi</sup>; y dentro de ellas cDC1: CD11b<sup>-</sup> y cDC2: CD11b<sup>+</sup>) de animales WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup>, inoculados con células EG7-OVA. El número absoluto fue normalizado por el número de células tumorales presente en cada tumor; se muestra el número de células IDO1 en 1x10<sup>6</sup> células tumorales. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes. ns (no significativo): p-valor>0,05.

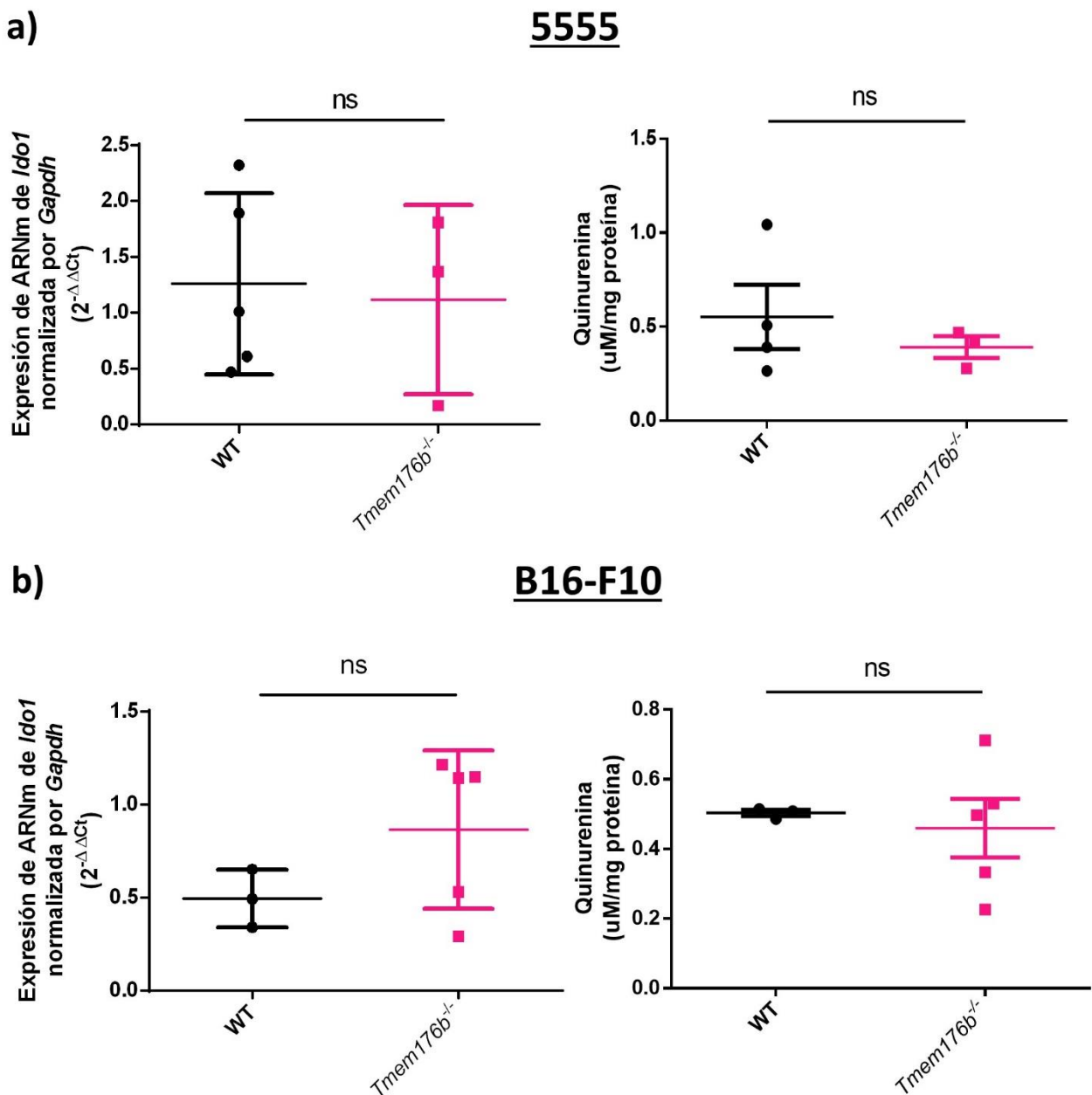
Cabe destacar, que si bien en los tumores de animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> observamos un mayor porcentaje de leucocitos dentro de las células IDO1 positivas que en los animales WT, al evaluar la expresión de IDO1 dentro de esta población celular no distinguimos diferencias significativas entre ambos grupos de animales. Por este motivo, adicionado al hecho de que el porcentaje de leucocitos que expresan IDO1 a nivel tumoral es relativamente bajo, creemos poco probable que estas células contribuyan de manera significativa a la mayor expresión y actividad de IDO1 desencadenada en los animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup>. Sin embargo, no descartamos que puedan estar jugando un papel relevante en la inducción de los diferentes mecanismos contra-reguladores que tienen lugar en el microambiente tumoral.

### *2.1.2 El nivel de expresión de IDO1 a nivel de la célula tumoral es relevante para el desencadenamiento de este mecanismo contra-regulador en tumores de animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup>*

Como se mencionó en la introducción, la expresión de IDO1 se ha reportado en diversos tipos de cáncer (Uyttenhove et al., 2003) y se ha demostrado que la presencia de IDO1 a nivel tumoral representa un pronóstico desfavorable en melanoma (Chevolet et al., 2014).

En base a estos antecedentes, nos propusimos investigar si en los tumores generados a partir de las líneas celulares de melanoma, 5555 y B16-F10, la sobre-activación del inflammasoma es capaz de generar un aumento en la expresión y actividad de IDO1 a nivel tumoral, de forma similar a como ocurre para la línea tumoral EG7-OVA. Para llevar esto a cabo, analizamos la expresión y actividad de IDO1, mediante RT-qPCR y ensayo de producción de quinurenina, respectivamente, en tumores de animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y WT inyectados con células 5555 y B16-F10.

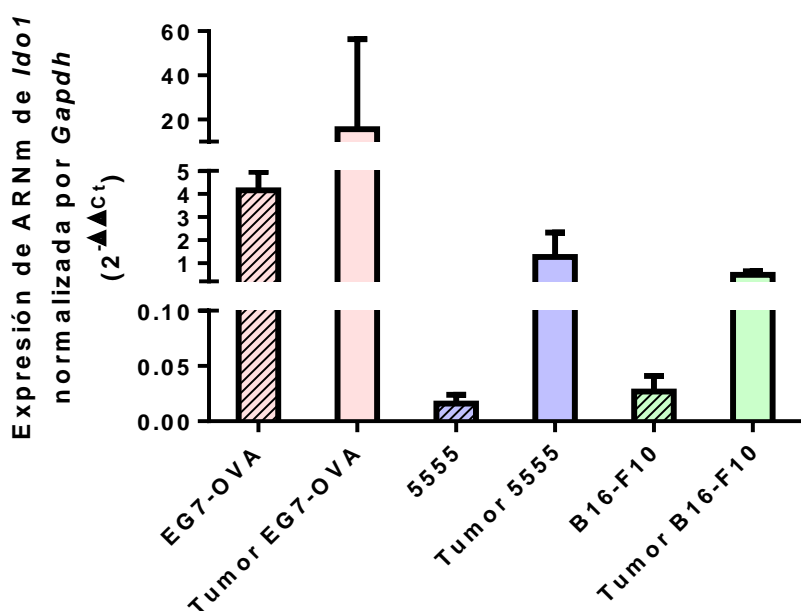
En estos experimentos no observamos diferencias en los niveles de expresión de ARNm de *Ido1*, ni en la producción de quinurenina entre animales WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup>, para ninguna de las dos líneas celulares inoculadas (Figura 12).



**Figura 12. Expresión y actividad enzimática de IDO1 en tumores 5555 y B16-F10 de animales WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup>.** Expresión de ARNm de *Ido1* normalizada por *Gapdh* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), evaluada mediante RT-qPCR (izquierda) y producción de quinurenina, analizada por el método del Reactivo de Ehrlich (derecha), en tumores obtenidos de ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y WT inoculados con células tumorales 5555 (a) o B16-F10 (b). Los resultados corresponden a un experimento para cada línea celular inoculada. ns (no significativo): p-valor>0,05.

Para intentar entender el motivo de esta diferencia respecto a lo observado para la línea EG7-OVA, decidimos analizar, mediante RT-qPCR, los niveles de expresión de ARNm de *Ido1* en cultivos celulares de las diferentes líneas tumorales utilizadas, ya que se ha reportado que la expresión de IDO1 a nivel de la célula tumoral es retroalimentada positivamente de forma autocrina (Litzenburger et al., 2014). En este sentido, es posible que una baja expresión de IDO1 a nivel de la línea celular pueda explicar que la sobre-activación del inflammasoma no genere un aumento significativo en la expresión de IDO1 en el microambiente tumoral.

En este experimento detectamos que las células EG7-OVA en cultivo expresan aproximadamente doscientas veces más *Ido1* que las líneas celulares 5555 y B16-F10 (media EG7-OVA: 4,16; media 5555: 0,016; media B16-F10: 0,027). Al comparar los niveles de expresión de tumores derivados de la inoculación de estas líneas celulares, observamos un aumento respecto a la presente en las líneas en cultivo, sin embargo, aún a nivel tumoral, la línea EG7-OVA mantiene una expresión de *Ido1* aproximadamente veinte veces mayor a las otras dos líneas tumorales evaluadas (media tumor EG7-OVA: 15,4; media tumor 5555: 1,2; media tumor B16-F10: 0,5) (Figura 13).

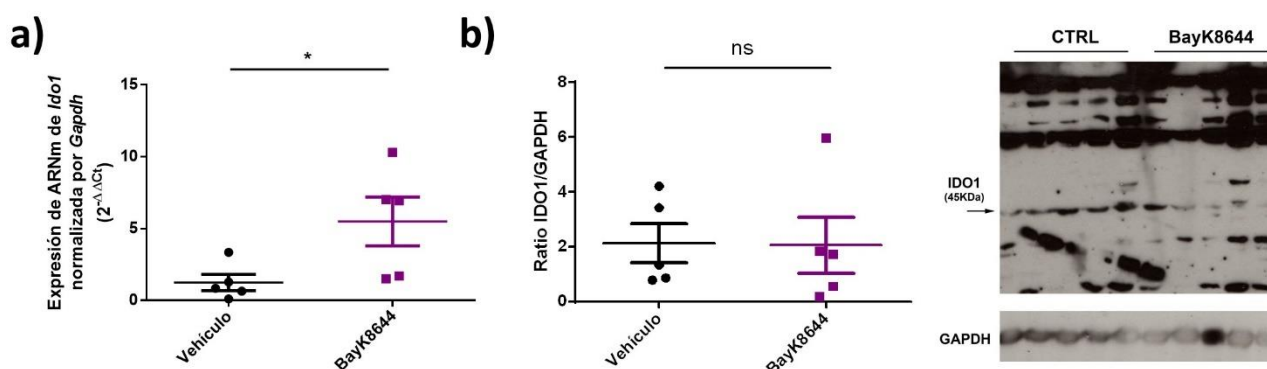


**Figura 13. Expresión de ARNm de *Ido1* en diferentes líneas celulares tumorales murinas.** Expresión de ARNm de *Ido1* normalizada por *Gapdh*, ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ), evaluada mediante RT-qPCR, en cultivos celulares de las líneas tumorales EG7-OVA, 5555 y B16-F10, y tumores derivados de dichas líneas.

## 2.2 Expresión de IDO1 en tumores de animales tratados con BayK8644

Como se mencionó anteriormente, el compuesto BayK8644 es capaz de inhibir farmacológicamente a TMEM176B, lo cual genera una sobre-activación del inflamasoma que fenocopia a la presente en los animales con la delección génica de *Tmem176b*. Teniendo esto en cuenta, decidimos investigar si el tratamiento con BayK8644 es capaz de generar un aumento en la expresión de IDO1, de igual manera a como sucede en los animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup>.

Para esto, en primer lugar, analizamos la expresión de IDO1 mediante RT-qPCR y Western Blot en animales inyectados con células EG7-OVA, y tratados con BayK8644 o Vehículo durante 14 días.

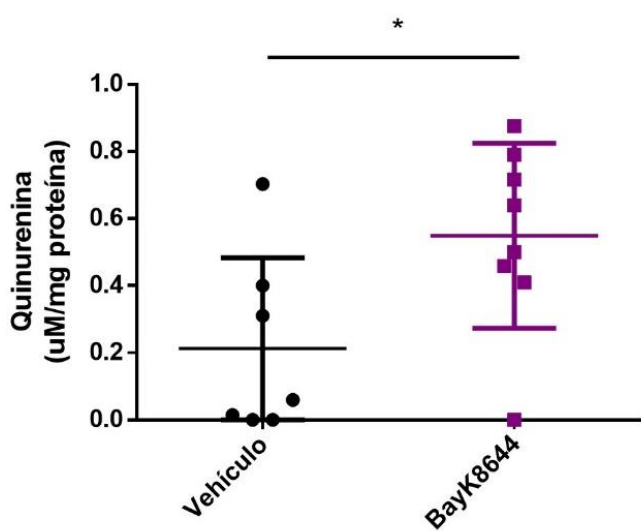


**Figura 14. Expresión de IDO1 en tumores EG7-OVA de animales tratados con BayK8644.** a) Expresión de ARNm de *Ido1* normalizada por *Gapdh*, ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), evaluada mediante RT-qPCR. b) Expresión de IDO1 a nivel proteico, normalizada por GAPDH (ratio IDO1/GAPDH), analizada mediante Western Blot. Las muestras se obtuvieron a partir de tumores de ratones inoculados con células tumorales EG7-OVA y tratados con BayK8644 (1mg/kg) o Vehículo por 14 días. Los resultados corresponden a un experimento. ns (no significativo): p-valor>0,05; \*: p-valor<0,05.

En estos análisis, observamos que los tumores de los animales tratados con BayK8644 poseen una expresión del ARNm de *Ido1* significativamente mayor que los tratados con Vehículo (Figura 14 a; p-valor=0,045). Cabe destacar que a nivel proteico no observamos una diferencia entre ambos grupos (Figura 14 b). Estos resultados se condicen con los

obtenidos previamente en los ratones con la delección génica de *Tmem176b* (Anexo 1, Figura S4).

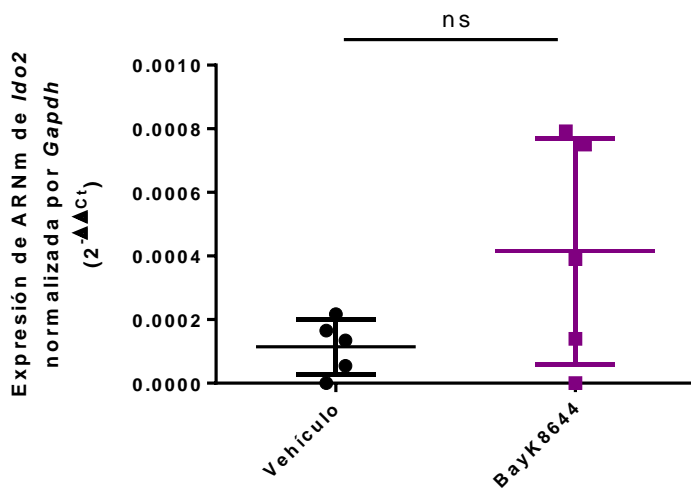
Dado que en los tumores de ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> demostramos un aumento en los niveles de quinurenina, respecto a los animales WT, a pesar de no haber un incremento de IDO1 a nivel proteico, decidimos evaluar la producción de quinurenina en los tumores de animales tratados con BayK8644. Para esto, realizamos la cuantificación de quinurenina en lisados tumorales EG7-OVA de animales administrados con Bayk8644 o Vehículo por 14 días, por el método del reactivo de Ehrlich.



**Figura 15. Presencia de quinurenina en tumores EG7-OVA de ratones tratados con BayK8644.** Análisis de la producción de quinurenina por el método del Reactivo de Ehrlich, en lisados tumorales de ratones inyectados con BayK8644 (1mg/kg) o Vehículo por 14 días. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes \* $p < 0,05$ .

En estos experimentos, observamos una producción de quinurenina significativamente mayor en los animales tratados con BayK8644 (Figura 15;  $p$ -valor=0,033); esto puede tomarse como un indicativo de una mayor actividad enzimática de IDO1 durante este tratamiento. Como mencionamos anteriormente, IDO1 no es la única enzima expresada a nivel tumoral capaz de dar lugar a la producción de quinurenina, por lo cual decidimos evaluar la contribución de IDO2 durante la sobre-activación del inflammasoma mediada por BayK8644. Para esto, medimos la expresión del ARNm de *Ido2* mediante RT-qPCR en los tumores de los animales tratados con BayK8644 o Vehículo.

En este caso, no detectamos diferencias en los niveles de expresión de ARNm de *Ido2* entre los animales tratados con BayK8644 o Vehículo (Figura 16). De esta manera, al igual que como sucede para los ratones con la delección génica de *Tmem176b*, el aumento de quinurenina a nivel tumoral en los animales tratados con BayK8644 estaría mediado principalmente por IDO1.



**Figura 16. Expresión de ARNm de *Ido2* en tumores EG7-OVA de ratones tratados con BayK8644 analizada por RT-PCR cuantitativa.** Expresión de ARNm de *Ido2* normalizada por *Gapdh* ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ), en tumores de animales inoculados con células EG7-OVA y tratados con BayK8644 (1mg/kg) o Vehículo durante 14 días. Los resultados corresponden a un experimento. ns (no significativo): p-valor>0,05.

### 2.2.1 Las células tumorales son las principales contribuyentes a la expresión aumentada de IDO1 en los animales tratados con BayK8644

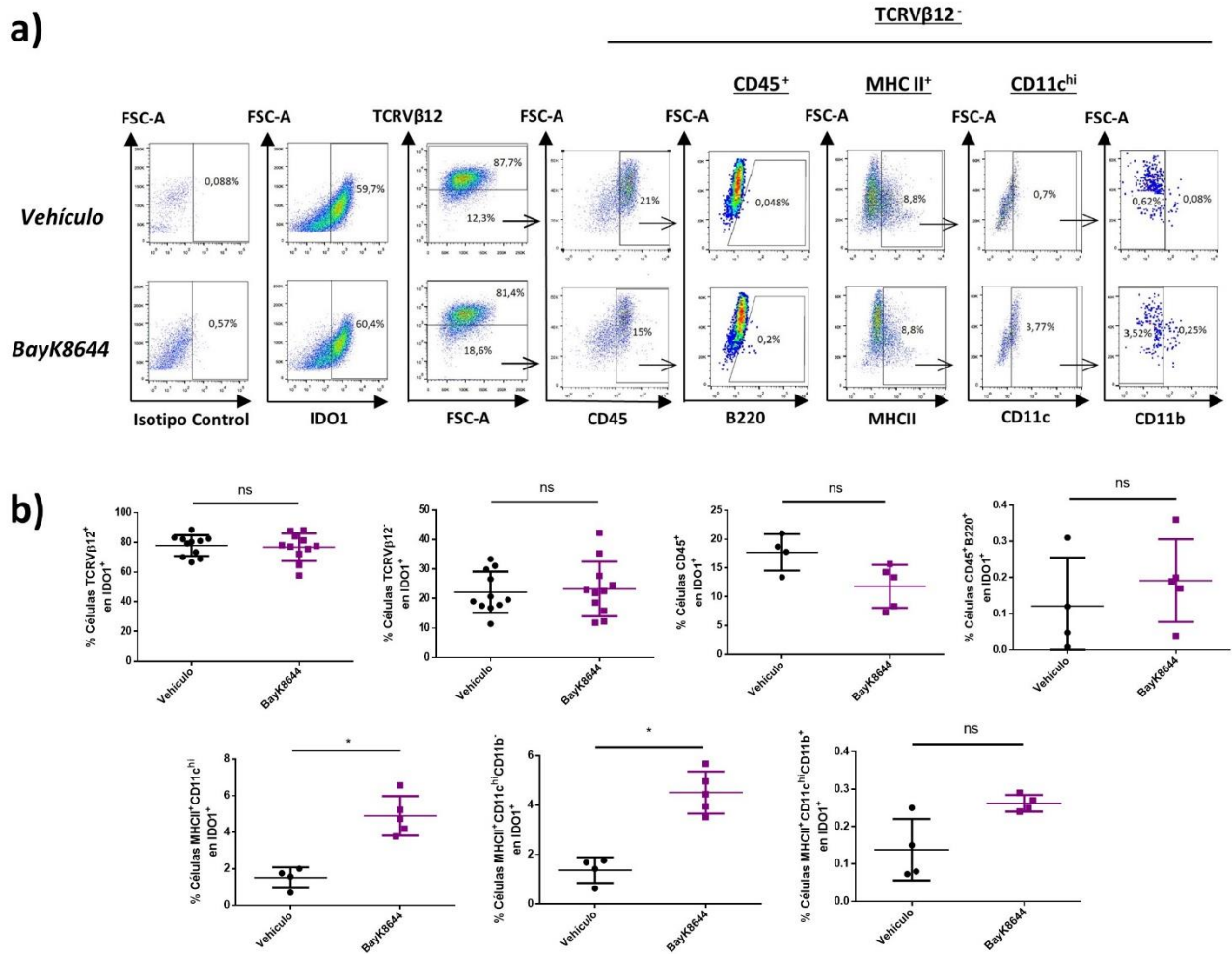
Como mencionamos previamente, son muchas las poblaciones celulares a nivel del microambiente tumoral que pueden expresar IDO1. Por este motivo, decidimos analizar la contribución de las diferentes poblaciones al aumento de la expresión y la actividad de IDO1 en los ratones tratados con BayK8644, para así determinar si existe un mecanismo común al presente durante la sobre-activación del inflammasoma dada por la delección génica de *Tmem176b*. Para esto, evaluamos la expresión de IDO1, mediante citometría de flujo, en tumores EG7-OVA de animales tratados con BayK8644 o Vehículo por 14 días, utilizando la estrategia anteriormente mencionada para los animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y WT.

En este caso, la población mayoritaria dentro de las células IDO1 positivas también corresponde a las células tumorales (TCRV $\beta$ 12<sup>+</sup>), representando aproximadamente un 77% tanto en los animales tratados con BayK8644 como con Vehículo (media Vehículo: 77,8 $\pm$ 2,1; media BayK8644 76,8 $\pm$ 2,8), sin diferencias significativas entre ambos grupos de animales; estos porcentajes son muy similares a los obtenidos para los animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y WT. Dentro las células no tumorales (TCRV $\beta$ 12<sup>-</sup>; correspondientes a aproximadamente un 23% de las células que expresan IDO1), 15% son leucocitos (CD45<sup>+</sup>) (media Vehículo: 17,7 $\pm$ 1,6; media BayK8644 11,8 $\pm$ 1,7). Dentro de esta población, un 0,15% aproximadamente corresponden a linfocitos B (CD45<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>) (media Vehículo: 0,12 $\pm$ 0,07; media BayK8644 0,19 $\pm$ 0,05). A su vez, 3,2% de las células no tumorales IDO1 positivas son células dendríticas (MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>hi</sup>) (media Vehículo: 1,5 $\pm$ 0,28; media BayK8644 4,9 $\pm$ 0,48), y dentro de estas, 2,9% corresponde a células dendríticas clase 1 (cDC1: MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>hi</sup>CD11b<sup>-</sup>) (media Vehículo: 1,4 $\pm$ 0,26; media BayK8644 4,5 $\pm$ 0,38) y 0,3% a células dendríticas clase 2 (cDC2: MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>hi</sup>CD11b<sup>+</sup>) (media Vehículo: 0,14 $\pm$ 0,04; media BayK8644 0,26 $\pm$ 0,01) (Figura 17). En este análisis, únicamente observamos diferencias significativas entre los animales tratados con BayK8644 y Vehículo en las poblaciones correspondientes a las células dendríticas MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>hi</sup> (p-valor=0,16) y cDC1 (p-valor=0,16), para las cuales detectamos un mayor porcentaje en los animales tratados con BayK8644 (Figura 17).

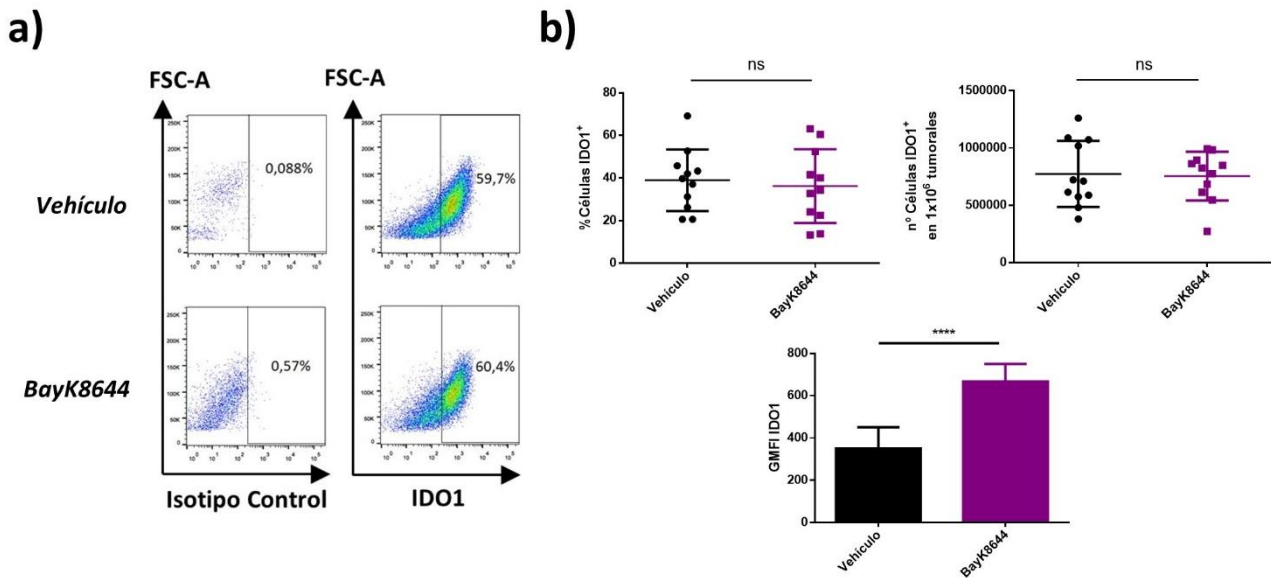
Respecto a la expresión global de IDO1 a nivel tumoral, observamos un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia de esta enzima en los animales tratados con BayK8644 (p-valor<0,0001), pero no en el porcentaje o número absoluto de células IDO1 positivas (Figura 18 b). Al analizar la expresión de IDO1 en las diferentes poblaciones celulares mencionadas, únicamente identificamos diferencias estadísticamente significativas entre los animales tratados con BayK8644 y Vehículo en las células tumorales. En dicha población celular, evidenciamos un aumento en la intensidad de



fluorescencia de IDO1 en los ratones administrados con BayK8644 ( $p$ -valor=0,0001), aunque no detectamos variaciones entre ambos grupos en el porcentaje o número absoluto de células tumorales IDO1<sup>+</sup> (Figura 19 b y 20 b). Estos resultados fenocopian los observados en animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y WT.



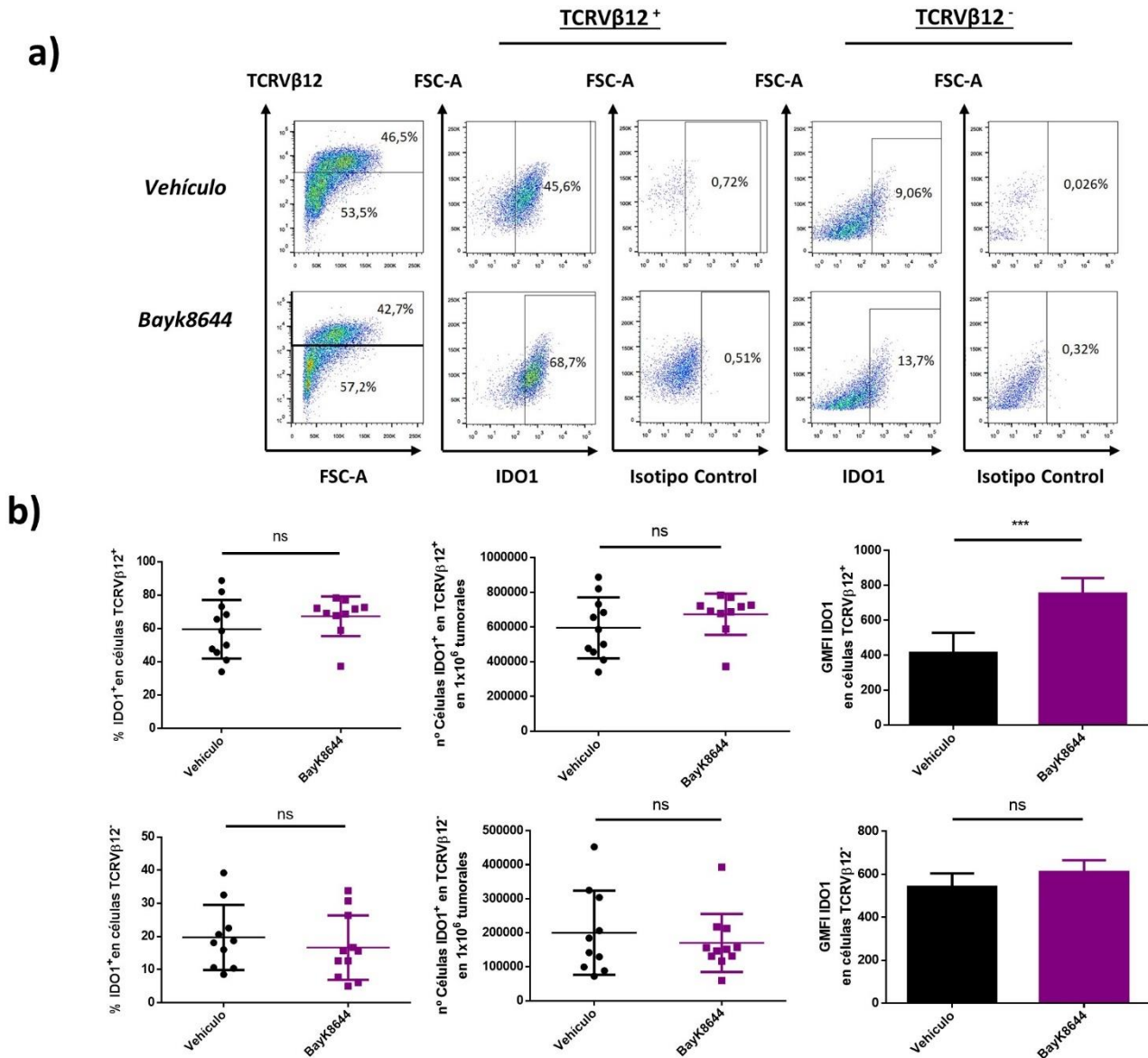
**Figura 17. Proporción de diferentes poblaciones celulares dentro de las células IDO1 positivas en tumores EG7-OVA de ratones tratados con BayK8644.** a) Estrategia de *gating* utilizada. Se muestra el marcado obtenido para el anticuerpo del control isotípico (Isotipo Control); este fue restado al marcado de IDO1 para cada muestra. b) Porcentaje de las diferentes poblaciones celulares analizadas dentro de las células IDO1 positivas en tumores de animales inoculados con células EG7-OVA y tratados con BayK8644 (1mg/kg) o Vehículo por 14 días. Las poblaciones se definieron como se describe a continuación. Células tumorales: TCRVβ12<sup>+</sup>; células no tumorales: TCRVβ12<sup>-</sup>; leucocitos: TCRVβ12<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>; linfocitos B: TCRVβ12<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>; células dendríticas: TCRVb12-MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>hi</sup>, dentro de las cuáles las células dendríticas clase 1 (cDC1) se definen como CD11b<sup>-</sup> y las células dendríticas clase 2 (cDC2) como CD11b<sup>+</sup>. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes. ns (no significativo):  $p$ -valor>0,05; \*:  $p$ -valor<0,05.



**Figura 18. Expresión de IDO1 a nivel global en tumores EG7-OVA de ratones tratados con BayK8644.** a) Estrategia de *gating* utilizada. Se muestra el marcado obtenido para el anticuerpo del control isotípico (Isotipo Control); este fue restado al marcado de IDO1 para cada muestra. b) Porcentaje (izquierda), número absoluto (medio) e intensidad de fluorescencia media (derecha) de células IDO1 positivas a nivel tumoral en animales inoculados con células EG7-OVA y tratados con BayK8644 (1mg/kg) o Vehículo por 14 días. El número absoluto fue normalizado por el número de células tumorales presente en cada tumor; se muestra el número de células IDO1 en  $1 \times 10^6$  células tumorales. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes. ns (no significativo):  $p$ -valor  $> 0,05$ ; \*\*\*\*:  $p$ -valor  $< 0,0001$

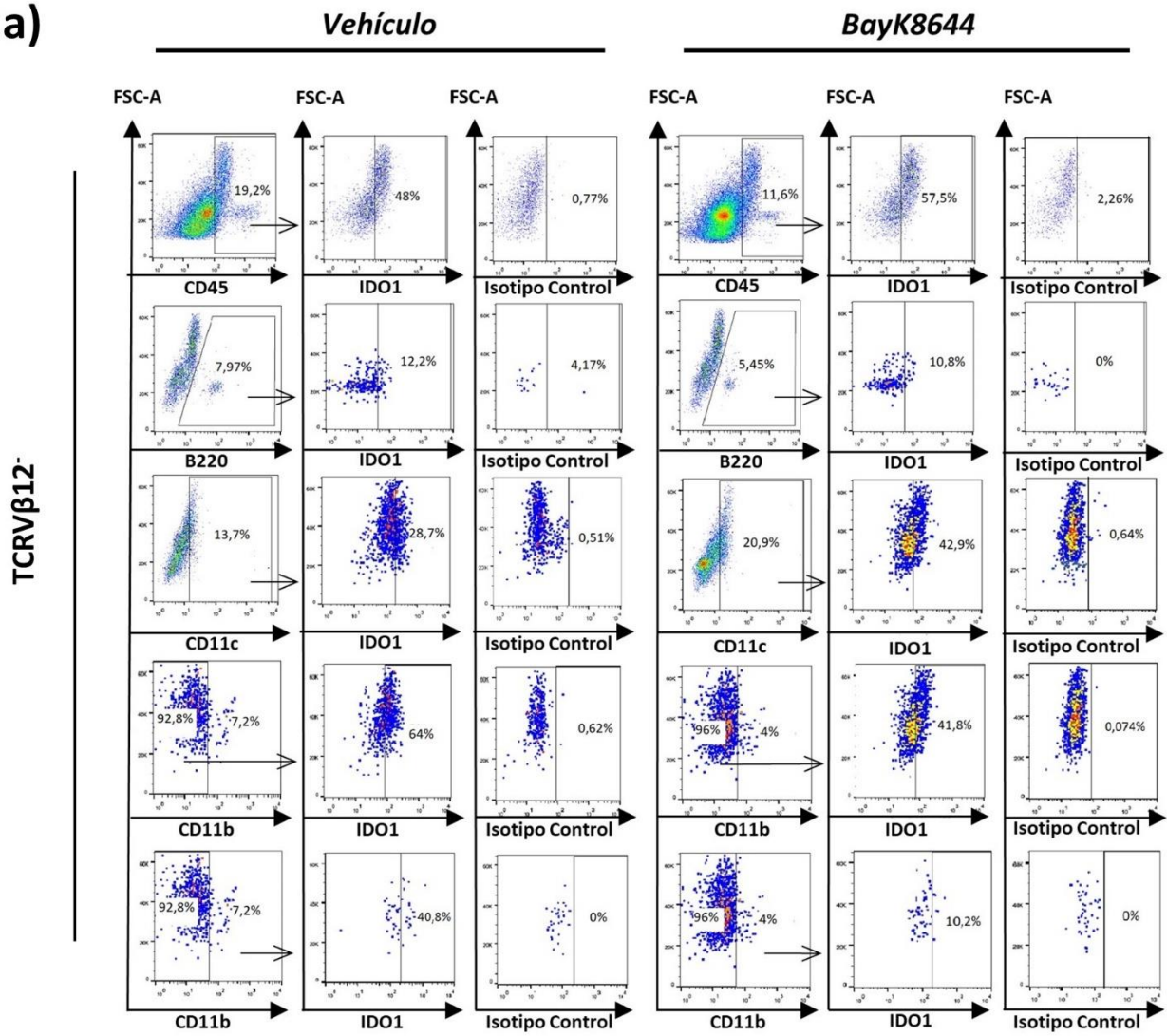
Es importante resaltar que, si bien existe una mayor proporción de células dendríticas MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>hi</sup> y cDC1 dentro de las células IDO1 positivas en los animales tratados con BayK8644, al evaluar la expresión de esta enzima dentro de dichas poblaciones, no encontramos diferencias respecto a los animales tratados con Vehículo. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que estos resultados fueron obtenidos a partir de un único experimento, por lo cual, debido al bajo número de animales utilizados, no es posible descartar que existen diferencias en la expresión de IDO1 en estas poblaciones celulares. A pesar de esto, considerando que dichas poblaciones representan un porcentaje muy bajo dentro de las células IDO1 positivas, es probable que, al igual que en los ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup>, la población con contribución mayoritaria a la expresión y actividad de IDO1

aumentada a nivel tumoral en los animales tratados con BayK8644, sea la correspondiente a las células tumorales.

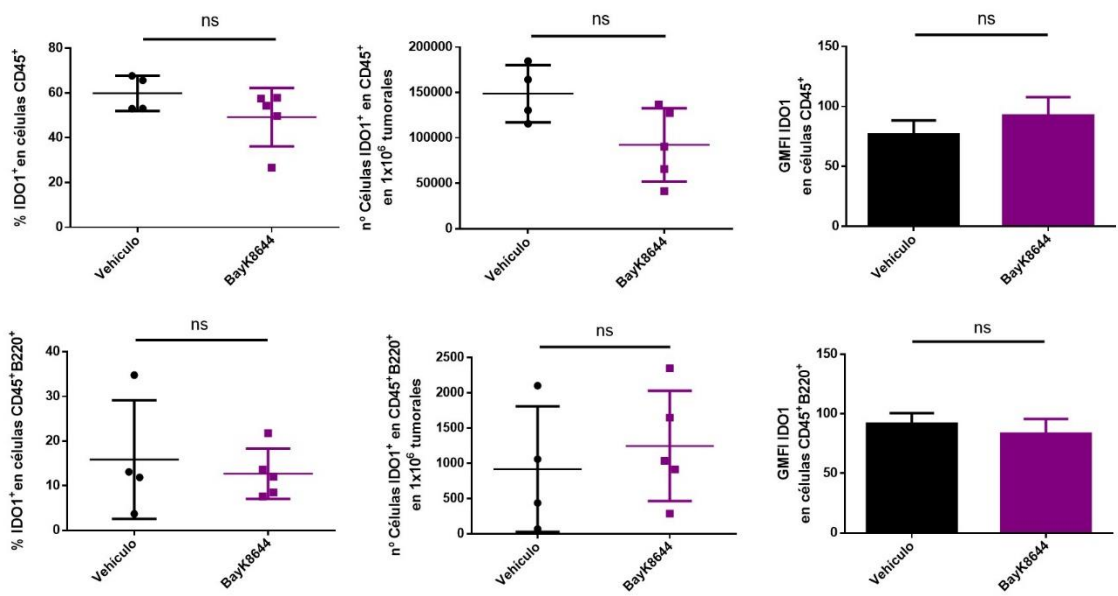


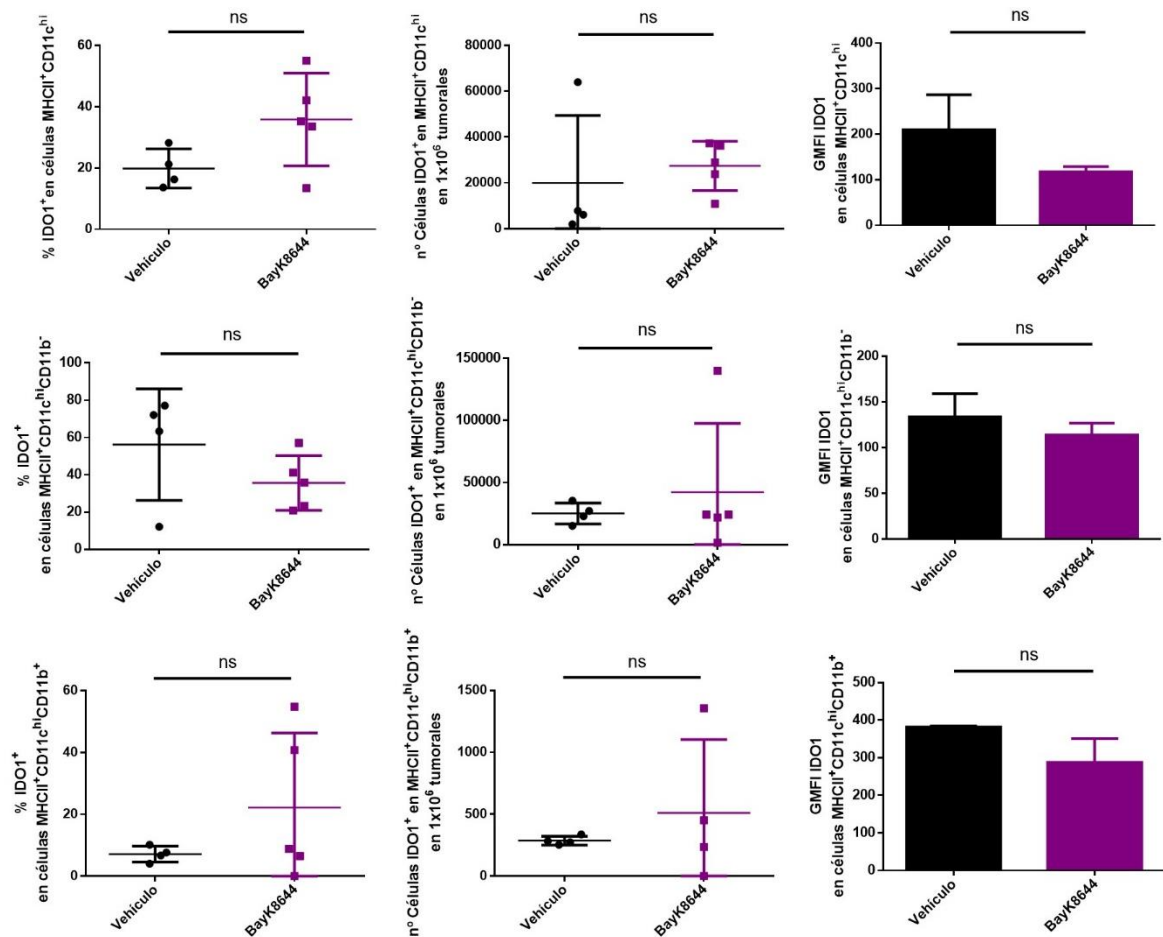
**Figura 19. Expresión de IDO1 en células tumorales y no tumorales de ratones tratados con BayK8644.** a) Estrategia de *gating* utilizada. Se muestra el marcado obtenido para el anticuerpo del control isotípico (Isotipo Control) en ambas poblaciones celulares; este fue restado al marcado de IDO1 para cada muestra. b) Porcentaje (izquierda), número absoluto (medio) e intensidad de fluorescencia media (derecha) de células IDO1 positivas en células tumorales (TCRVβ12<sup>+</sup>; arriba) y no tumorales (TCRVβ12<sup>-</sup>; abajo) de animales inoculados con células EG7-OVA y tratados con BayK8644 (1mg/kg) o Vehículo por 14 días. El número absoluto fue normalizado por el número de células tumorales presente en cada tumor; se muestra el número de células IDO1 en 1x10<sup>6</sup> células tumorales. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes. ns (no significativo): p-valor>0,05. \*\*\*: p-valor<0,001.

a)



b)



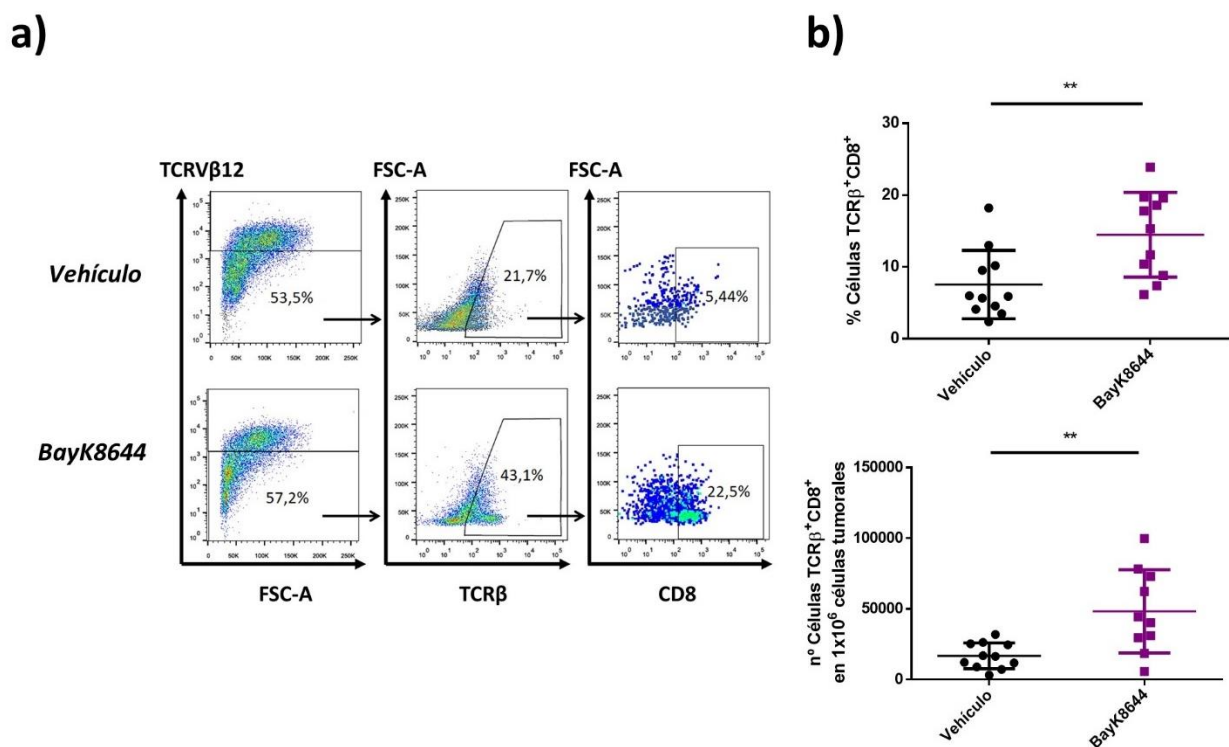


**Figura 20. Expresión de IDO1 en diferentes poblaciones infiltrantes en tumores de ratones tratados con BayK8644.** a) Estrategia de *gating* utilizada. Se muestra el marcado obtenido para el anticuerpo del control isotípico (Isotipo Control) en las diferentes poblaciones celulares; este fue restado al marcado de IDO1 para cada muestra. b) Porcentaje (izquierda), número absoluto (medio) e intensidad de fluorescencia media (derecha) de células IDO1 positivas en leucocitos (CD45<sup>+</sup>), linfocitos B (CD45<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>) y células dendríticas (MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>hi</sup>; y dentro de ellas CDC1: CD11b<sup>-</sup> y CDC2: CD11b<sup>+</sup>) de animales inoculados con células EG7-OVA y tratados con BayK8644 (1mg/kg) o Vehículo por 14 días. El número absoluto fue normalizado por el número de células tumorales presente en cada tumor; se muestra el número de células IDO1 en 1x10<sup>6</sup> células tumorales. Los resultados corresponden un experimento. ns (no significativo): p-valor>0,05.

### 2.2.2 Las células T CD8<sup>+</sup> tienen un rol relevante en la expresión aumentada de IDO1 en las células tumorales de animales tratados con BayK8644

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado las células T CD8<sup>+</sup> son capaces de inducir la expresión de IDO1 a nivel tumoral (Spranger et al., 2014), y resultados previos obtenidos por nuestro equipo demuestran que las mismas se encuentran aumentadas en ratones Tmem176b<sup>-/-</sup> donde el inflammasoma se encuentra desinhibido (Segovia-Russo et

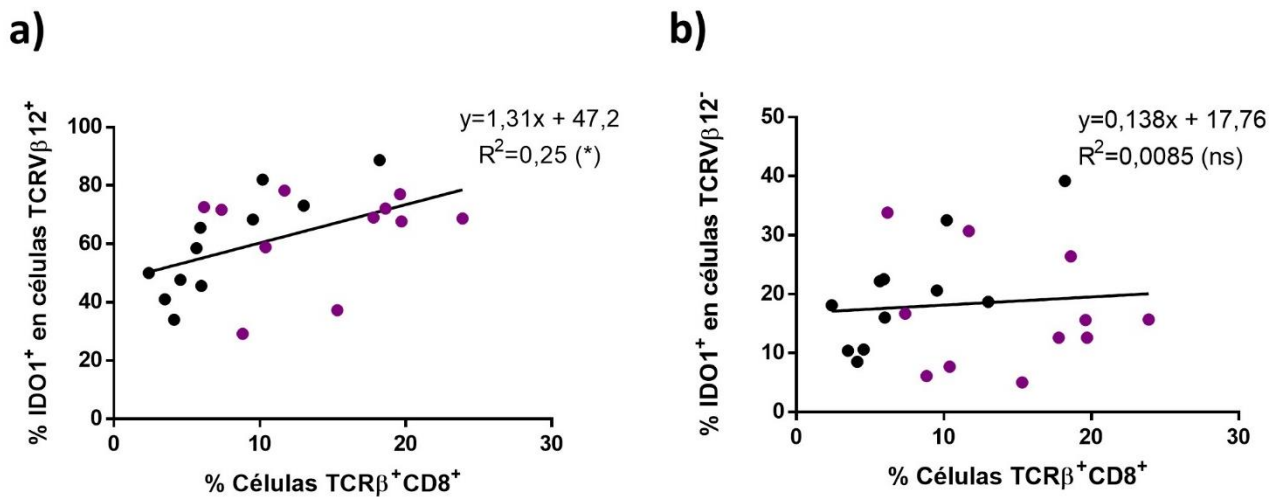
al., 2019; Anexo 2, Figura S4). Por este motivo, decidimos evaluar si la sobre-activación del inflammasoma mediada por el tratamiento con BayK8644 es capaz de generar un aumento en el infiltrado de células T CD8+ a nivel tumoral, que pueda explicar la expresión aumentada de IDO1 en las células tumorales de los animales administrados con dicho compuesto. Para esto, utilizando citometría de flujo, examinamos la presencia de linfocitos T CD8+, definidos como TCRVβ12-TCRβ+CD8+, en los tumores de animales tratados con BayK8644 o Vehículo durante 14 días.



**Figura 21. Análisis del infiltrado de linfocitos T CD8+ en tumores de animales tratados con BayK8644.** a) Estrategia de *gating* utilizada. b) Porcentaje (arriba) y número absoluto (abajo) de células T CD8+ (TCRβ+CD8+) presentes en los tumores de animales inoculados con células EG7-OVA y tratados con BayK8644 (1mg/kg) o Vehículo durante 14 días. El número absoluto fue normalizado por el número de células tumorales presente en cada tumor; se muestra el número de células IDO1 en 1x10<sup>6</sup> células tumorales. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes. \*\*: p-valor<0,01.

En estos experimentos, observamos un aumento significativo en el porcentaje (p-valor=0,0065) y en el número absoluto (p-valor=0,0032) de células T CD8+ en los tumores de ratones tratados con BayK8644, respecto a los administrados con Vehículo (Figura

21). Adicionalmente, evidenciamos una correlación lineal positiva, estadísticamente significativa entre el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> que infiltran el tumor y las células tumorales que expresan IDO1 (IDO1<sup>+</sup> en TCRVβ12<sup>+</sup>) (p-valor=0,018), pero no con el porcentaje de células no tumorales IDO1 positivas (IDO1<sup>+</sup> en TCRVβ12<sup>-</sup>) (Figura 22).

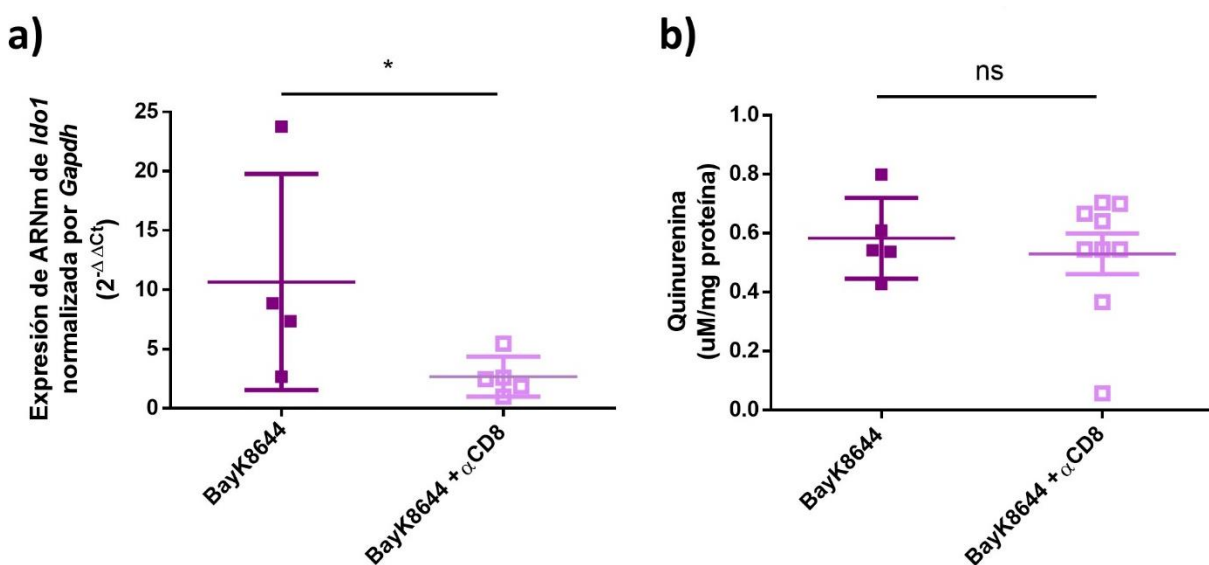


**Figura 22. Correlación del infiltrado de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y la expresión de IDO1 a nivel tumoral.** Regresión lineal e índice de correlación ( $R^2$ ) del porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> infiltrantes del tumor (% de células TCRβ<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) y células IDO1 positivas dentro de la población tumoral (% IDO1<sup>+</sup> en células TCRVβ12<sup>+</sup>) (a) y no tumoral (% IDO1<sup>+</sup> en células TCRVβ12<sup>-</sup>) (b), de ratones inoculados con células EG7-OVA y tratados con BayK8644 (1mg/kg) (círculos violetas) o Vehículo (círculos negros) durante 14 días. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes. ns (no significativo): p-valor>0,05; \*: p-valor<0,05.

Para continuar ahondando en el posible rol de las células T CD8<sup>+</sup> en la inducción de la expresión de IDO1 en los animales tratados con BayK8644, decimos investigar los niveles de expresión y actividad enzimática de IDO1 a nivel tumoral durante el tratamiento con BayK8644, en un contexto de ausencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Para esto, realizamos la depleción *in vivo* de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CD8, en animales inoculados con células EG7-OVA y tratados con BayK8644 durante 14 días. Posteriormente, analizamos la expresión de ARNm de *Ido1* mediante RT-qPCR y los niveles de quinurenina utilizando el método del Reactivo de Ehrlich. Verificamos la

correcta depleción de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en el bazo de estos animales, mediante citometría de flujo (Anexo 1, Figura S5).

En estos experimentos observamos que los animales tratados con BayK8644 y anti-CD8 presentan una disminución significativa en la expresión de ARNm de *Ido1* a nivel tumoral, respecto a los ratones tratados únicamente con BayK8644 (p-valor=0,032) (Figura 23 a). Sin embargo, no observamos diferencias entre ambos grupos de animales en la producción de quinurenina (Figura 23 b).



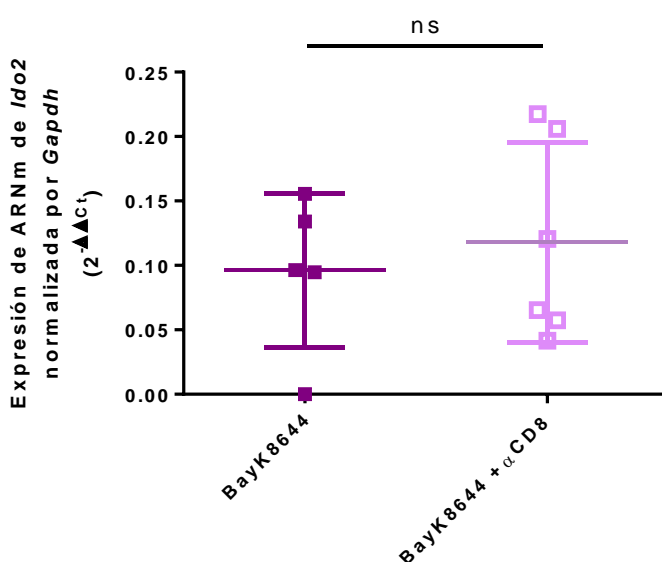
**Figura 23. Expresión y actividad enzimática de IDO1 en tumores de animales tratados con BayK8644 en un contexto de depleción de linfocitos T CD8<sup>+</sup>.** a) Expresión de ARNm de *Ido1* normalizada por *Gapdh* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), evaluada mediante RT-qPCR. b) Producción de quinurenina analizada por el método del Reactivo de Ehrlich. Las muestras se obtuvieron a partir de tumores de ratones inoculados con células EG7-OVA y tratados con BayK8644 (1mg/kg) durante 14 días, con o sin tratamiento anti-CD8 (100 $\mu$ g/ratón) cada 3 días. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes. ns (no significativo): p-valor>0,05; \*p-valor:<0,05.

Estos resultados parecen indicar que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son necesarios para la expresión aumentada del ARNm *Ido1* durante el tratamiento con BayK8644, pero que su depleción no afectaría la actividad enzimática de dicha molécula. En este sentido, es posible que exista algún mecanismo contra-regulador compensatorio que dé lugar a la producción de quinurenina, independientemente de la acción de IDO1. Teniendo esto en



cuenta, decidimos analizar la expresión de ARNm de *Ido2* mediante RT-qPCR, en los tumores de animales tratados con BayK8644, con o sin tratamiento con el anticuerpo anti-CD8.

En estos análisis no detectamos diferencias en los niveles de expresión de IDO2 entre los animales tratados con BayK8644 depletados de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, y los tratados con BayK8644 en ausencia de depleción (Figura 24).



**Figura 24. Expresión de ARNm de *Ido2* en tumores EG7-OVA de ratones tratados con BayK8644 en un contexto de depleción de linfocitos T CD8<sup>+</sup>.** Expresión de ARNm de *Ido2* normalizada por *Gapdh* ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ), evaluada mediante RT-qPCR en tumores de animales inoculados con células EG7-OVA y tratados con BayK8644 (1mg/kg) durante 14 días, con o sin tratamiento anti-CD8 (100 $\mu$ g/ratón) cada 3 días. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes. ns (no significativo): p-valor>0,05.

### 2.2.3 La terapia con el inhibidor de IDO1 1-MT podría dar lugar a una mejora de los efectos anti-tumorales del BayK8644

Lo obtenido previamente en esta tesis demuestra que la expresión de IDO1 a nivel tumoral podría ser un mecanismo contra-regulador relevante desencadenado durante el tratamiento con BayK8644, pudiendo llevar a una disminución de los potenciales efectos anti-tumorales de dicho compuesto. Por esta razón, consideramos que la asociación de BayK8644 con inhibidores de IDO1 sería una buena estrategia para mejorar el efecto del BayK8644, pudiendo vencer los mecanismos de resistencia inmunológica mediados por dicha enzima.

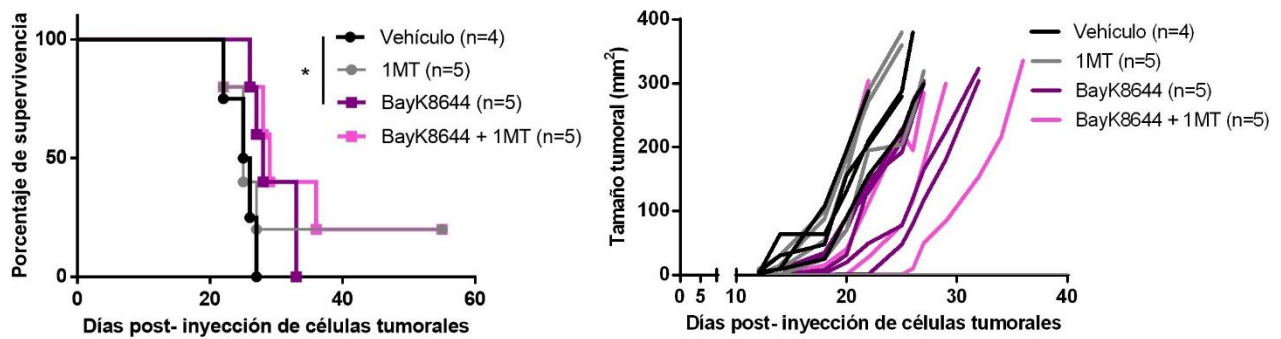
Yendo en este sentido, decidimos analizar si el tratamiento combinado de BayK8644 y 1-Metil-Triptófano (1-MT), un inhibidor competitivo de IDO1, que ha demostrado limitar el crecimiento en tumores en los cuales hay una sobre-expresión de dicha enzima (Friberg et al., 2002; Uyttenhove et al., 2003), es capaz de mejorar la sobrevida de los animales respecto a la monoterapia con BayK8644. Para esto, evaluamos el crecimiento tumoral y la sobrevida de ratones inyectados con células tumorales EG7-OVA, y tratados con BayK8644 o Vehículo en combinación con 1-MT, siguiendo el esquema de tratamiento que se muestra en la Figura 25 a.

En este ensayo observamos que el tratamiento con BayK8644 logró prolongar de forma significativa la sobrevida de los ratones, respecto al vehículo (Figura 25 b; p-valor=0,035), confirmando resultados previos de nuestro laboratorio, respecto al efecto anti-tumoral de dicho compuesto. En contraste, el tratamiento en monoterapia con 1MT no parecería tener un efecto significativo en la sobrevida de los animales (Figura 25 b). Por otra parte, en la terapia combinada con BayK8644 y 1MT no observamos un efecto en la sobrevida de los ratones, respecto a la monoterapia con estos compuestos, sin embargo, detectamos que los tumores de los animales con el doble tratamiento parecen crecer más lentamente, aunque no de forma muy marcada (Figura 25 b).

a)



b)



**Figura 25. Efecto de la inhibición de IDO1 durante la terapia con BayK8644** a) Esquema de inyección y tratamiento realizado (generado con bioRENDER). b) Curva de supervivencia (izquierda) y crecimiento tumoral (derecha) de ratones inoculados con células tumorales EG7-OVA y tratados con BayK8644 (1mg/kg) o Vehículo de forma intra-peritoneal, en monoterapia o en combinación con el inhibidor D-1MT (4mg/mL) o Control, administrado en el agua de bebida, según muestra el esquema. El porcentaje de supervivencia refiere al número de animales que sobrevivieron respecto al total de ratones inyectados. \*: p-valor<0,05.

## DISCUSIÓN

---

### Parte 1: Rol de la IL-17 durante la respuesta anti-tumoral mediada por la sobre-activación del inflammasoma y el bloqueo de puntos de control inmunológico

En esta parte de la tesis demostramos que la IL-17 no tendría efecto en el tratamiento en monoterapia con el BayK8644, ya que no observamos diferencias en la supervivencia entre los animales *Il-17a<sup>-/-</sup>* y WT. En cambio, durante el tratamiento en monoterapia con el anti-PD-1, la delección génica de *Il-17a* parece mejorar la supervivencia de los animales tratados, demostrando un efecto perjudicial de esta citoquina sobre la acción anti-tumoral de este tratamiento.

Una posible explicación a estos resultados podría estar dada por el hecho de que los ratones *Il-17a<sup>-/-</sup>* utilizados solo presentan la delección génica de la IL-17A, de forma que son capaces de producir IL-17F. Esta citoquina presenta homología y funciones redundantes con las de la IL-17A (Jin y Dong, 2013), y es reconocida por el mismo receptor heterodimérico, formado por las subunidades IL-17RA e IL-17RC (Chang y Dong, 2011). De esta manera, la IL-17F podría compensar la carencia de IL-17A, y una sobre-compensación explicaría el hecho de que los animales *Il-17a<sup>-/-</sup>* respondan mejor al anti-PD1.

Otra explicación posible para los resultados observados, es que en el contexto del tratamiento con anti-PD-1, la IL-17 juegue un rol pro-tumoral en lugar de anti-tumoral: en un contexto donde prevalecen los roles pro-tumorales de la IL-17, la delección génica de esta citoquina podría favorecer la respuesta anti-tumoral. Como se mencionó previamente, se ha descrito ampliamente que la IL-17 puede poseer ambos roles, según el ambiente inmunológico en el cual se desencadena la respuesta (Amicarella et al., 2017;

Chang et al., 2014, 2014; Punkenburg et al., 2016; Qian et al., 2017). De esta manera, la IL-17 puede tanto favorecer la activación y el reclutamiento de células inmunes fundamentales para la eliminación tumoral (Hirahara et al., 2000; Honorati et al., 2003; Kryczek et al., 2009; Y. Lu et al., 2018), como promover el fenómeno de angiogénesis necesario para la progresión tumoral.

Esta idea de una dependencia del contexto inmunológico para la acción anti- tumoral o pro- tumoral de la IL-17 es reforzada por los resultados obtenidos en este trabajo durante el tratamiento con la terapia combinada de BayK8644 y anti-PD-1. En estos experimentos, observamos que la delección génica de la *il-17a* ocasiona una disminución en el efecto anti-tumoral de dicho tratamiento, indicando que en este contexto la IL-17 tendría un rol anti-tumoral relevante.

Existe evidencia de que parte de las funciones del inflamasoma en la respuesta a infecciones bacterianas y fúngicas están dadas por la promoción de la diferenciación a células Th17 y la subsecuente producción de IL-17 (Dunne et al., 2010, Hise et al., 2009). En este sentido, se ha demostrado que la IL-1 $\beta$ , principal citoquina producida durante la activación del inflamasoma, tiene un rol importante en la diferenciación, supervivencia, expansión y en los efectos inflamatorios de las células Th17 (Chung et al., 2009).

Se ha evidenciado que la estimulación por IL-1 $\beta$  ocasiona la inducción de una isoforma de FoxP3, que al estar presente inhibe la funcionalidad de las células Treg y favorece la diferenciación hacia células Th17 con un fenotipo inflamatorio (Mailer et al., 2015). A su vez, la presencia aumentada de IL-1 $\beta$  disminuye la expresión de FoxP3 inducida por TGF- $\beta$ , lo que impide la conversión de las células Th17 hacia un fenotipo Treg (Deng et al., 2019); como se explicó anteriormente en esta tesis, este fenotipo Treg “Ex-Th17” puede ir en detrimento de la respuesta anti-tumoral. Por otro lado, como se mencionó en la introducción, la IL-1 $\beta$  favorece la diferenciación de las células Th17 hacia un fenotipo Th1

“Ex-Th17”, también denominado patogénico, con la capacidad de producir IFN $\gamma$  (Uchiyama et al., 2017), citoquina que posee potentes efectos anti-tumorales.

Teniendo esto en cuenta, es probable que la alta producción de IL-1 $\beta$  presente durante el tratamiento con BayK8644 sea capaz de llevar a las células Th17 hacia este perfil inflamatorio o patogénico, del tipo Th1 “Ex-Th17”, con efectos anti-tumorales, impidiendo la diferenciación hacia un fenotipo de tipo Treg no patogénico. En este contexto de polarización de las células Th17 hacia un fenotipo inflamatorio efector, dichas células son capaces de secretar IFN $\gamma$  además de la IL-17. En este sentido, se ha planteado que el entorno de citoquinas en el cual se encuentra la IL-17 puede determinar su rol durante la respuesta anti-tumoral, y en línea con esta hipótesis, se ha observado que la co-producción de IL-17, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  por células Th17 se correlaciona con una mejora en la supervivencia y mayor sensibilidad durante las terapias anti-tumorales de bloqueo de puntos de control (Kuen et al., 2020).

De esta manera, en un contexto de sobre-activación del inflamasoma desencadenado por el tratamiento con BayK8644, en este caso durante la terapia combinada con anti-PD-1, la IL-17 estaría teniendo efectos anti-tumorales, dados por la polarización de las células Th17, que tiene lugar gracias a la presencia aumentada de IL-1 $\beta$ . En este contexto inmunológico, la IL-17 sería capaz de dar lugar a la generación de fuertes mecanismos anti-tumorales, como ser la activación de células NK y linfocitos T CD8 $^{+}$ , entre otros, favoreciendo la eliminación tumoral. Estos efectos serían capaces de actuar a favor de la respuesta anti-tumoral mediada por el anti-PD-1, lo cual se condice con el hecho de que la delección génica de la *Il-17a* ocasiona, en la terapia combinada de BayK8644 y anti-PD-1, una disminución de los efectos anti-tumorales de dicha terapia.

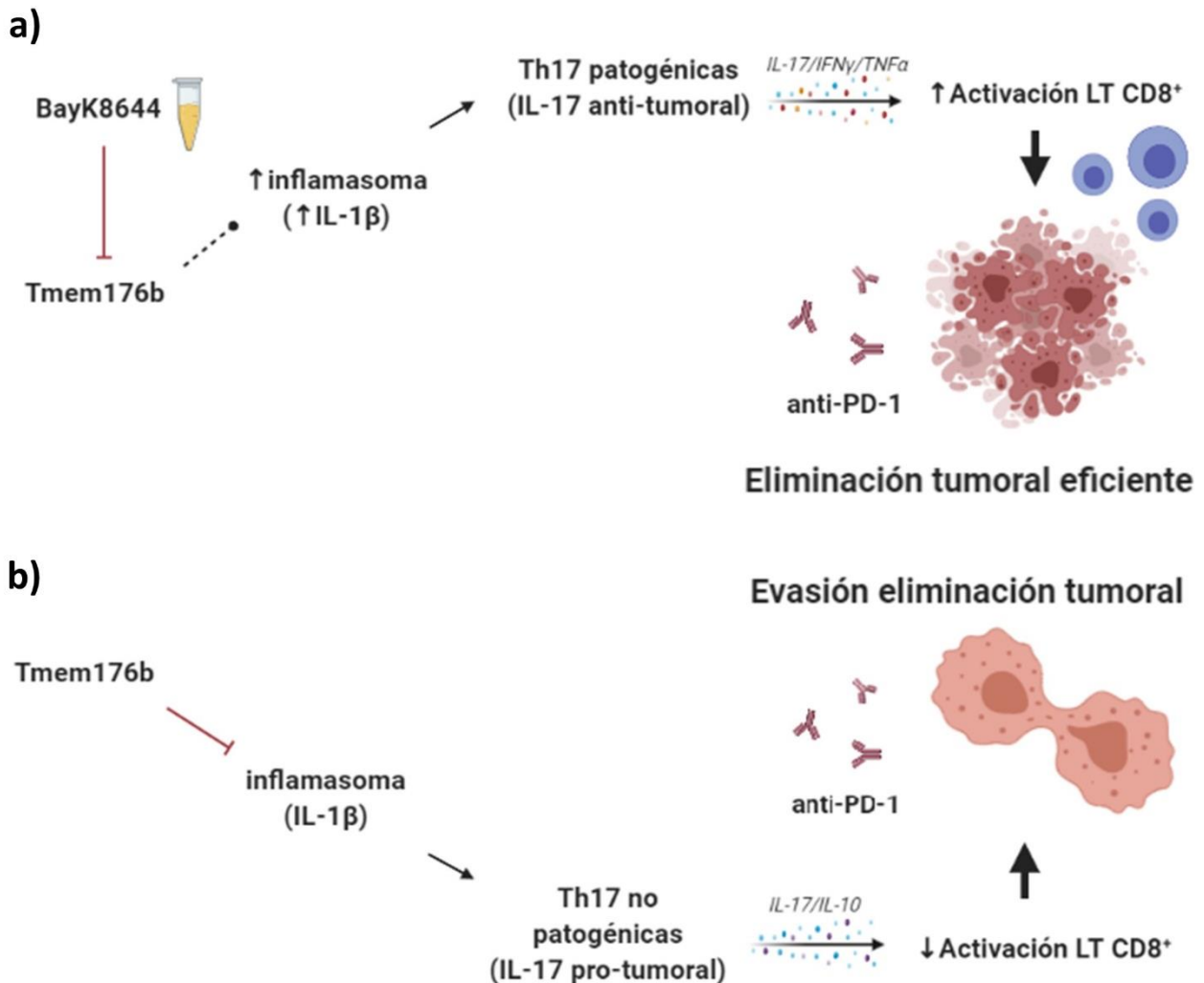
Por el contrario, en ausencia de este contexto de sobre-activación del inflamasoma desencadenado por la administración de BayK8644, es decir durante el tratamiento con anti-PD-1 en monoterapia, es posible que se dé una polarización de las células Th17 hacia

un fenotipo Treg “Ex-Th17” no patogénico; existe evidencia de que las células Treg que producen IL-17 tienen un potente efecto inmunosupresor (Kryczek et al., 2011). En esta situación, la IL-17, al estar en un ambiente regulador y asociado a citoquinas con capacidades inmuno-reguladoras, como la IL-10, posiblemente juegue roles pro-tumorales, como, por ejemplo, el desencadenamiento de angiogénesis (Pan et al., 2015), de forma que su delección culmina siendo beneficiosa para la respuesta anti-tumoral. Esto explica el hecho de que la delección génica de la *Il-17a* favorece la respuesta anti-tumoral mediada por anti-PD-1 durante la monoterapia con este compuesto.

En suma, los resultados obtenidos en este punto de la tesis parecen indicar que en ausencia de la sobre-activación del inflamasoma mediada por el BayK8644, la IL-17 tendría una acción pro-tumoral, siendo de esta forma perjudicial para el tratamiento con anti-PD-1. En contraste, en un contexto de sobre-activación del inflamasoma, durante el doble tratamiento con BayK8644 y anti-PD-1, la IL-17 parecería tener un efecto anti-tumoral, relevante para favorecer los efectos de la terapia con anti-PD-1. El mecanismo propuesto se esquematiza en la Figura 26.

Algo importante a destacar es que no observamos diferencias en el efecto del BayK8644 entre animales *Il-17a*<sup>-/-</sup> y WT, cuando este tratamiento fue administrado en monoterapia. Teniendo esto en cuenta, es probable que la producción aumentada de IL-1 $\beta$  durante la sobre-activación del inflamasoma dada por el tratamiento con BayK8644 no sea suficiente para lograr los efectos anti-tumorales mediados por la IL-17 mencionados anteriormente.

En este sentido, parecería que se requieren otros mecanismos, posiblemente aportados por la acción del anti-PD-1, para que la sobre-activación del inflamasoma dé lugar a la respuesta anti-tumoral mediada por la respuesta Th17. Un posible mecanismo podría estar dado por la capacidad del anti-PD-1 de modular el agotamiento de las células T CD8<sup>+</sup> (Pauken y Wherry, 2015; Wei et al., 2018), evitando que estas células sean disfuncionales para la respuesta anti-tumoral.



**Figura 26. Mecanismo propuesto para el efecto de la sobre-activación del inflammasoma, mediada por el compuesto BayK8644, sobre las poblaciones de células Th17 durante el tratamiento con el bloqueador de punto de control anti-PD-1.** a) La inhibición farmacológica de TMEM176B con el compuesto BayK8644, daría lugar a una sobre-activación del inflammasoma, con la consecuente producción aumentada de IL-1 $\beta$ , lo cual favorecería la diferenciación de los linfocitos Th17 hacia un fenotipo patogénico (Th1<sup>Ex-Th17</sup>), secretor de IL-17, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ . Estas citoquinas ocasionarían la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, los cuales serían capaces de desencadenar la eliminación de las células tumorales, favoreciendo así el efecto anti-tumoral del anti-PD-1. b) En ausencia del tratamiento con BayK8644, TMEM176B impediría la activación del inflammasoma y, por tanto, la producción de IL-1 $\beta$ , lo cual llevaría a la diferenciación de las células Th17 hacia un fenotipo no patogénico (Treg “Ex-Th17”), secretor de IL-17 e IL-10. Dichas citoquinas en conjunto darían lugar a efectos inmuno-reguladores, que impedirían la activación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, con lo cual se generaría un ambiente no favorable para los efectos anti-tumorales del anti-PD-1, llevando así a la evasión de la eliminación tumoral. Esquema generado con bioRENDER



En un contexto de activación crónica de la respuesta inmune de forma crónica, como es el caso del cáncer, se ha demostrado que las células T CD8<sup>+</sup> desarrollan un fenotipo exhausto en el cual se encuentran en un estado fisiológico y metabólico disfuncional para la eliminación tumoral (Zhang et al., 2020). En este escenario, es posible que los efectos anti-tumorales que puedan ser favorecidos por una respuesta Th17 con un fenotipo inflamatorio no sean tan relevantes, ya que las citoquinas producidas durante dicha respuesta no serían capaces de favorecer significativamente la respuesta de las células T CD8<sup>+</sup>, debido al estado disfuncional de las mismas. De esta manera, dada la relevancia de las células T CD8<sup>+</sup> durante la respuesta anti-tumoral, no se verían efectos favorecedores de la respuesta mediados por la IL-17, más allá de que posiblemente los mecanismos desencadenados por esta citoquina, mediados por la sobre-activación del inflamasoma dada por el tratamiento con BayK8644 igualmente estén teniendo lugar.

Durante la terapia con el anti-PD-1 el agotamiento de las células T CD8<sup>+</sup> es modulado en una manera favorecedora de la respuesta anti-tumoral. Se ha demostrado que el tratamiento con anti-PD-1 lleva a la expansión de una subpoblación de células T CD8<sup>+</sup>, denominadas progenitoras exhaustas, que en este contexto de sobre-activación del inflamasoma proliferan y se diferencian en células T terminalmente exhaustas, que son capaces de controlar el crecimiento tumoral (Miller et al., 2019; Siddiqui et al., 2019). En esta situación, la respuesta anti-tumoral mediada por células T CD8<sup>+</sup> sería de alguna manera “rescatada” por este compuesto, de forma que los mecanismos desencadenados por una respuesta Th17, con un fenotipo inflamatorio, tendrían un rol importante en favorecer la acción de estas células T CD8<sup>+</sup> como se describió previamente. Como se mencionó anteriormente, para que se ejerzan los mecanismos anti-tumorales beneficiosos de esta respuesta es necesario que estos mecanismos mediados por el anti-PD-1 se acompañen de señales pro-inflamatorias, en nuestro modelo aportadas por la sobre-activación del inflamasoma mediada por el BayK8644. En este sentido, nuestro equipo ha

propuesto que con el *timing* adecuado de administración, la combinación de ambas terapias es capaz de favorecer la respuesta T CD8<sup>+</sup>, impidiendo el detrimento de esta respuesta mediado por el exhausting de dichas células (Hill et al., 2020).

Un último punto no menor a destacar, en lo que respecta a esta parte de la tesis, refiere a las células involucradas en la producción de la IL-17 a nivel tumoral. Si bien resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que durante la sobre-activación del inflammasoma que tienen lugar en los animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> existe un acúmulo de células Th17 en el ganglio linfático drenante del tumor de estos ratones, existe evidencia de que la IL-17 puede ser generada por otras poblaciones celulares. Entre estas se encuentran las células gamma delta T17 ( $\gamma\delta$ T17), células T CD8<sup>+</sup> Tc17, células linfoides innatas de tipo 3 (ILC3), e incluso macrófagos, mastocitos y neutrófilos (Kuen et al., 2020). En este sentido, aunque en este trabajo atribuimos los efectos observados de la IL-17 en los diferentes tratamientos analizados a respuestas mediadas por células Th17, no podemos descartar que en nuestro modelo de estudio existan también otras fuentes de IL-17, que puedan ser relevantes para los mecanismos desencadenados. Teniendo esto en cuenta, sería interesante analizar el infiltrado de células Th17 en los tumores de los animales administrados con los diferentes tratamientos utilizados (BayK8644, anti-PD-1 o una combinación de ambas) y determinar su fenotipo. Este análisis es sumamente relevante para confirmar la hipótesis de que el BayK8644 ocasiona la generación y diferenciación de células Th17 hacia un fenotipo inflamatorio efector, necesario para la respuesta anti-tumoral.

## Parte 2: Mecanismos contra-reguladores mediados por IDO1 desencadenados por la sobre-activación del inflammasoma

En esta sección de la tesis demostramos que la sobre-activación del inflammasoma, tanto por la delección génica de *Tmem176b* (demostrado en mi tesis de grado) o por la inhibición farmacológica de esta proteína con el compuesto BayK8644, daría lugar al desencadenamiento de un mecanismo contra-regulador mediado por IDO1, siendo que en ambos contextos existe un aumento en la expresión y actividad de esta enzima.

En ambos casos, observamos que la población que contribuye mayoritariamente a la expresión de IDO1 a nivel del microambiente tumoral corresponde a las células tumorales, las cuales representan aproximadamente un 75% de las células IDO1<sup>+</sup>. A su vez, estas células corresponden a la única población en la cual detectamos un aumento en los niveles de expresión de IDO1 en los animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y tratados BayK8644, en comparación a sus respectivos grupos controles.

Estos resultados indicarían que la inhibición farmacológica de *Tmem176b* no solo fenocopia la delección génica de este canal iónico al nivel demostrado previamente, sino que también es capaz de dar lugar a los mismos mecanismos contra-reguladores.

Como se ha mencionado previamente, existan otras poblaciones en las cuales la expresión de IDO1 a nivel tumoral es relevante, sin embargo, nosotros no observamos diferencias en la expresión de IDO1 entre animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y WT o tratados con BayK8644 y vehículo en otras poblaciones analizadas en esta tesis. Cabe destacar que esto no descarta que estas poblaciones puedan contribuir a la expresión de IDO1 a nivel tumoral, ya que, en todos los casos, dichas poblaciones expresan dicha enzima. Adicionalmente, es necesario resaltar que existen varias poblaciones celulares para las cuales se ha descrito la expresión de IDO1 a nivel tumoral que no fueron analizadas en este trabajo, como los macrófagos (Herrera-Rios et al., 2020), las células endoteliales y

los fibroblastos asociados al tumor (Meierson et al., 2020). Sin embargo, dado que no observamos un aumento en la expresión de IDO1 en las células no tumorales durante la sobre-activación del inflamasoma, creemos poco probable que exista un aumento en la expresión de IDO1 en este contexto en las diferentes poblaciones mencionadas. A pesar de esto, consideramos que puede ser relevante investigar la expresión de IDO1 en dichas poblaciones, ya que es posible que en la globalidad se puedan “diluir” las diferencias en la expresión de IDO1 entre los grupos, a pesar de existir diferencias en estas poblaciones específicas.

Considerando lo anteriormente mencionado, creemos que en nuestro modelo es probable que la sobre-activación del inflamasoma ocasione, por mecanismos que serán explicados a continuación, un aumento en la expresión de IDO1 a nivel de la célula tumoral. Dicho fenómeno podría posibilitar el escape de las células tumorales de la eliminación, constituyendo un mecanismo de evasión inmunológica ya que la expresión de IDO1 por las células tumorales se ha determinado como un factor relevante en la inhibición de la respuesta anti-tumoral (Uyttenhove et al., 2003).

Adicionalmente, creemos que la expresión de IDO1 a nivel de la célula tumoral podría ocasionar un aumento en la expresión de esta enzima tanto por las células tumorales como por las infiltrantes, dando así lugar a una retroalimentación positiva en la expresión de IDO1 a nivel tumoral, siendo de esta manera un mecanismo contra- regulador relevante durante la sobre-activación del inflamasoma. En este sentido, se ha demostrado que la expresión de IDO1 a nivel tumoral es retroalimentada positivamente por la propia enzima, a través de un eje que involucra el receptor de hidrocarburos de arilo (AHR), la IL-6 y el factor de transcripción STAT3. En el mecanismo descrito para este eje de retroalimentación se postula que la quinurenina generada por la actividad de IDO1 interacciona con el receptor AHR, lo cual lleva a la secreción de IL-6, la cual activa el factor de transcripción STAT3 y lleva a la expresión de IDO1 en diferentes células

presentes en el microambiente tumoral (Litzenburger et al., 2014). De esta manera, es posible que, por este u otro mecanismo, la expresión de IDO1 a nivel de las células tumorales sea suficiente para inducir la expresión de esta enzima a nivel tumoral como mecanismo contra-regulador relevante durante la respuesta anti-tumoral mediada por la sobre-activación del inflamasoma.

En línea con este posible mecanismo, evidenciamos que el nivel de expresión basal de IDO1 en la célula tumoral es relevante para dar lugar a una expresión aumentada de dicha enzima a nivel tumoral en ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup>, ya que para líneas celulares de melanoma, 5555 y B16-F10, las cuales poseen una baja expresión basal de IDO1, no observamos un aumento en la expresión o actividad de esta enzima en los tumores generados a partir de dichas líneas en los animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup>, respecto a los WT. De esta manera, pese a haber una sobre-activación del inflamasoma en los animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup>, esta no sería capaz de desencadenar la expresión de IDO1 a nivel tumoral como un mecanismo contra-regulador relevante, ya que es probable que los bajos niveles de IDO1 a nivel basal no sean suficientes para desencadenar mecanismos de retro-alimentación positiva para su expresión, como el descrito anteriormente.

Por otro lado, en lo que respecta a los mecanismos capaces de dar lugar a esta expresión aumentada de IDO1 a nivel tumoral, resultados previos de nuestro laboratorio (Segovia-Russo et al., 2019; Anexo), y obtenidos en esta tesis, demuestran que durante la sobre-activación del inflamasoma mediada por la delección génica de *Tmem176b* o su inhibición con BayK8644 existe un aumento en el infiltrado de células T CD8<sup>+</sup> a nivel tumoral. Adicionalmente, observamos una correlación positiva significativa entre la expresión de IDO1 a nivel de la célula tumoral y el infiltrado de células T CD8<sup>+</sup> en animales tratados con BayK8644, lo cual puede ser un indicio de que, en este modelo, dichas células podrían ser relevantes para la inducción de IDO1 en las células tumorales. En este sentido, se ha demostrado que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son capaces de inducir la expresión de IDO1 a nivel

tumoral (Spranger et al., 2014). Cabe destacar que esta correlación no la obtuvimos para los animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup>, sin embargo, debemos resaltar que, en los experimentos realizados en esta tesis en dichos animales no logramos un buen marcado de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, por lo cual no podemos descartar que este mecanismo también se encuentre presente en estos animales.

En línea con esto, demostramos que la depleción de las células T CD8<sup>+</sup> durante el tratamiento con BayK8644 ocasiona una disminución en la expresión de IDO1, respecto a los animales tratados con este compuesto sin la depleción de las células. Estos resultados parecen indicar que en los animales tratados con BayK8644, las células T CD8<sup>+</sup> que infiltran el tumor podrían estar teniendo un rol en el desencadenamiento de un mecanismo contra-regulador mediado por IDO1.

Sin embargo, al analizar la actividad de esta enzima, no encontramos una diferencia entre los animales tratados con BayK8644 con o sin depleción de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Teniendo esto en cuenta, analizamos la expresión de IDO2 en los tumores de estos animales, ya que, como mencionamos anteriormente, la enzima IDO2 también es capaz de dar lugar a la producción de quinurenina a través de la degradación del triptófano, y se ha demostrado que es capaz de compensar la falta de IDO1, ya que puede actuar como un mecanismo compensatorio para la producción de quinurenina en este contexto (Muller et al., 2019; Smith et al., 2012). Si bien no observamos diferencias en la expresión de IDO2 entre los animales tratados con BayK8644 con depleción de células T CD8<sup>+</sup> y sin depleción, creemos que esto no indica que dicha enzima no sea relevante en mantener los niveles de quinurenina en los animales depletados de estas células, en los cuales hay una disminución de la expresión de IDO1. Dado que en ambos grupos de animales hay una expresión de IDO2 a nivel tumoral, no podemos descartar que en ausencia de IDO1, esta contribuya para dar lugar a una producción de quinurenina similar a la generada por IDO1.

Por otra parte, es posible que en un contexto de depleción de células T CD8<sup>+</sup> la enzima triptófano 2,3- dioxigenasa (TDO) pueda tener un rol importante como mecanismo compensatorio para la producción de quinurenina a nivel tumoral (Muller et al., 2019; Smith et al., 2012). TDO corresponde a otra molécula capaz de degradar el triptófano por la vía de la quinurenina, que se encuentra expresada en diferentes tipos tumorales (Ye et al., 2019). Si bien en este trabajo no evaluamos la expresión de esta enzima, creemos que sería relevante analizar la expresión de TDO en los tumores de animales tratados con BayK8644 con y sin depleción de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, para determinar si tiene un rol como mecanismo contra-regulador que compense la disminución de IDO1 en un contexto de depleción de células T CD8<sup>+</sup>.

Teniendo todo esto en cuenta, creemos que los resultados obtenidos proporcionan indicios de que las células T CD8<sup>+</sup> serían relevantes para el desencadenamiento de un mecanismo contra-regulador mediado por IDO1 en un contexto de sobre-activación del inflamasoma, aunque sería necesario ahondar más en los mecanismos desencadenados en un contexto de depleción de células T CD8<sup>+</sup>, para entender el rol de estas células en el desencadenamiento de la expresión de IDO1 a nivel tumoral.

Hasta aquí, los resultados obtenidos indican que, en nuestro modelo de estudio, la sobre-activación del inflamasoma presente en animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y tratados con BayK8644, contribuye al aumento en el infiltrado de células T CD8<sup>+</sup> a nivel del microambiente tumoral, las cuales podrían inducir la expresión de IDO1 a nivel de la célula tumoral. En este escenario, la expresión de IDO1 representaría un claro mecanismo de retroalimentación negativa, ya que se ha demostrado que esta enzima es capaz de inhibir la actividad de las células T CD8<sup>+</sup>. De esta manera, las células T CD8<sup>+</sup> reclutadas a nivel tumoral podrían estar por un lado dando lugar a mecanismos anti-tumorales necesarios para la eliminación del cáncer, pero a su vez estarían llevando a la generación de

mecanismos contra-reguladores que van en detrimento de la respuesta anti-tumoral favorecida por el BayK8644.

Algo relevante de analizar respecta a las señales que favorecen el reclutamiento de las células T CD8<sup>+</sup> al microambiente tumoral durante la sobre-activación del inflamasoma. Como se mencionó previamente el IFN $\gamma$ , citoquina asociada a la respuesta T CD8<sup>+</sup> (Bhat et al., 2017), es considerado un fuerte inductor de IDO1 (Holtzhausen et al., 2015; Zhao et al., 2018). Es posible que, en nuestro modelo, la sobre-activación del inflamasoma presente en animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y tratados con BayK8644, tras la generación de diferentes citoquinas pro-inflamatorias, desencadene mecanismos que culminen en la expresión de IFN $\gamma$ , el cual es capaz de inducir la expresión de IDO1. Si bien hasta el momento no hemos reportado diferencias en la expresión a nivel de ARNm de esta molécula entre animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y WT (Segovia-Russo et al., 2019; Anexo 2), sería interesante ahondar en el rol del IFN $\gamma$  durante la sobre-activación del inflamasoma para entender en su rol durante el desencadenamiento de la expresión de IDO1 a nivel tumoral en este contexto.

En este sentido, y retomando lo anteriormente planteado, en referencia al rol de la expresión basal de IDO1 en la célula tumoral para desencadenar este mecanismo a nivel tumoral, se ha reportado que el IFN $\gamma$ , no es capaz de inducir un aumento en la expresión de IDO1 en líneas celulares con baja expresión de esta enzima (Levina et al., 2012). Esto podría explicar por qué en los tumores desarrollados a partir de las líneas celulares con baja expresión de IDO1, esta enzima no se encuentra aumentada en animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup>.

En referencia a las posibles fuentes de IFN $\gamma$  en el contexto de la sobre-activación del inflamasoma, creemos que es probable que la respuesta Th17 desencadenada en este contexto pueda tener un rol substancial. Como se ha mencionado varias veces en esta tesis, el fenotipo Th1 “Ex-Th1” patogénico es capaz de dar lugar a la producción de IFN $\gamma$ ,



y es probable, que en un contexto de sobre-activación del inflamasoma, las células Th17 se encuentren diferenciadas hacia esta población. Como mencionamos anteriormente, resultados previos de nuestro laboratorio demuestran una acumulación de células Th17 en los ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> (Segovia-Russo et al., 2019; Anexo 2). Sin embargo, resta demostrar dicha acumulación en los animales tratados con BayK8644, al igual que el fenotipo de las mismas, para poder ahondar en el posible rol de esta población como fuente de IFN $\gamma$ .

Cabe destacar que la expresión de IDO1 a nivel tumoral se ha correlacionado también a la presencia de otros mecanismos inmunosupresores, como ser la presencia de células Treg FoxP3<sup>+</sup> y la expresión de PD-1 y PD-L1 (Brody et al., 2009; Spranger et al., 2014). En este sentido, resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que los animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> presentan un aumento en el infiltrado de células Treg a nivel tumoral respecto a los WT (Segovia-Russo et al., 2019; Anexo 2). Sería relevante entonces evaluar si esto sucede también en los animales tratados con BayK8644, y si, además en este contexto de sobre-activación del inflamasoma existe una mayor expresión de moléculas como PD-1 y PD-L1. Realizar estos análisis sería poder ahondar más en los diversos mecanismos que dan lugar a la expresión de esta enzima a nivel tumoral en nuestro modelo.

Lo expuesto hasta aquí deja en claro que la expresión de IDO1 es un mecanismo contra-regulador relevante desencadenado durante la sobre-activación del inflamasoma, siendo que el mismo constituye un sistema de retroalimentación negativa que va en detrimento de la respuesta anti-tumoral desencadenada en este contexto. Desde un punto de vista fisiológico esto es importante para evitar las respuestas exacerbadas, sin embargo, en el contexto tumoral, el desencadenamiento de este tipo de mecanismo permite el avance de la patología.

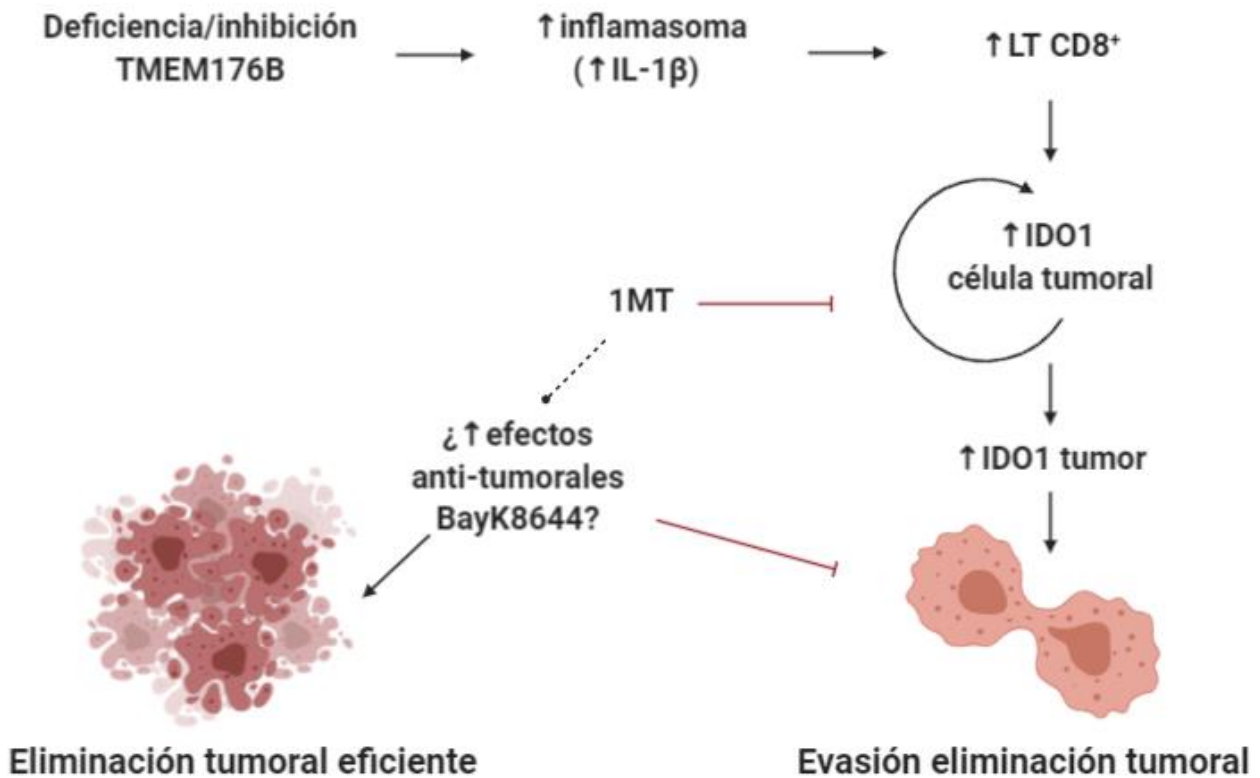
Por este motivo, es relevante entender los mecanismos desencadenados durante la sobre-activación del inflamasoma, para poder así controlarlos y mejorar la efectividad de los tratamientos enfocados en el fenómeno de sobre-activación del inflamasoma. En nuestro caso, el compuesto BayK8644 ha presentado resultados muy prometedores en lo que refiere a la respuesta anti-tumoral, tanto en monoterapia como en combinación con compuestos como el anti-CTLA-4 y el anti-PD-1 (Segovia-Russo et al., 2019; Anexo 2). A pesar de esto, es claro que no todos los individuos se ven beneficiados con este tratamiento, lo cual hace sumamente relevante conocer y vencer estos mecanismos de resistencia.

Tomando en consideración los resultados obtenidos en esta tesis, decidimos evaluar la efectividad de la terapia combinada del BayK8644 y el inhibidor de IDO1 1-MT. En estos experimentos no observamos una mejora de la sobrevida en la terapia combinada, respecto a la monoterapia de estos fármacos, aunque tampoco evidenciamos un efecto significativo en la monoterapia con 1-MT. A pesar de esto, detectamos un leve retardo en el crecimiento tumoral de los animales tratados con la combinación de las terapias, aunque no muy notorio. Teniendo en cuenta estos resultados, parecería que la inhibición de IDO1 con 1-MT no es suficiente para prolongar la sobrevida de los animales en este esquema de tratamiento, ya sea en monoterapia o en combinación al tratamiento con BayK8644. Sin embargo, es importante destacar que los resultados obtenidos en esta tesis corresponden a un primer experimento con el tratamiento con 1-MT, en el cual se utilizó pequeño número de animales (5 ratones por grupo). En este sentido, sería pertinente continuar evaluando las dosis y tiempos de tratamiento con el inhibidor de IDO1, para llegar a la terapia óptima en nuestro modelo de trabajo.

En línea con estos resultados, existen reportes de que el tratamiento con 1-MT no es suficiente para desencadenar una completa regresión tumoral en monoterapia (Holmgaard et al., 2013). Sin embargo, esto no explicaría la falta de respuesta en la

terapia combinada. En este aspecto, creemos que es posible que el aumento en la expresión de IDO1 mediado por el BayK8644 requiera de un cierto tiempo para tener lugar, dado que son varios los fenómenos que deben desencadenarse para aumentar la expresión de esta enzima, según lo expuesto en este trabajo. Considerando el mecanismo de acción del 1-MT, explicado en la introducción de este trabajo, es probable que su efectividad dependa de que se hayan desencadenado los efectos inmunoreguladores mediados por IDO1, o al menos que dicha enzima se haya comenzado a expresar. Por este motivo, creemos que una primera aproximación para mejorar el efecto de la terapia combinada sería evaluar la cinética de expresión de IDO1 a nivel tumoral, y comenzar el tratamiento en el momento en el cual se detecte la expresión de esta enzima a nivel tumoral. En este trabajo la expresión y actividad de IDO1 se analizó a día 14 post-inyección, momento en el cual el tratamiento con BayK8644 fue finalizado, pero no tenemos evidencia de que esta enzima se comience a expresar al día 3, momento en el cual comenzamos el tratamiento con el 1-MT. Una vez evaluado esto, podría plantearse otro protocolo de administración, en el cual el comienzo y el tiempo de duración del tratamiento sea acorde al mecanismo contra-regulador que se está intentando contrarrestar.

En la figura 27 se esquematiza el mecanismo propuesto, que podría explicar el aumento en la expresión de IDO1 a nivel tumoral durante la sobre-activación del inflammasoma en nuestro modelo de estudio.



**Figura 27. Mecanismo propuesto para la expresión aumentada de IDO1 a nivel tumoral durante la sobre-activación del inflammasoma.** La sobre-activación del inflammasoma, dada por la delección génica de *Tmem176b* o la inhibición farmacológica de la proteína con el compuesto BayK8644, daría lugar a una sobre-activación del inflammasoma, con la consecuente producción aumentada de IL-1 $\beta$ , lo cual favorecería el reclutamiento de linfocitos T CD8<sup>+</sup> a nivel tumoral. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> reclutados al tumor serían capaces de dar lugar a un aumento en la expresión de IDO1 a nivel de la célula tumoral, lo cual ocasionaría, gracias a un sistema de retroalimentación positiva de la expresión de IDO1, un aumento en la expresión de esta enzima a nivel global en el tumor. Esto funcionaría como un mecanismo contra-regulador relevante, capaz de llevar a la evasión de la eliminación de las células tumorales. La utilización del inhibidor de IDO1, 1-MT, sería capaz de impedir el desencadenamiento de la expresión aumentada de IDO1 durante la sobre-activación del inflammasoma, constituyendo así un compuesto potencialmente capaz de mejorar los efectos anti-tumorales del BayK8644, favoreciendo posiblemente la eliminación tumoral dada por dicho compuesto. Esquema generado con bioRENDER

## CONCLUSIONES

---

En esta tesis de maestría logramos describir la relevancia de los mecanismos efectores mediados por la IL-17 y los mecanismos contra-reguladores mediados por IDO1 en un contexto de sobre-activación del inflamasoma, durante la respuesta anti-tumoral, dada por la inhibición de la molécula TMEM176B.

Los resultados obtenidos en esta tesis nos permitieron entender parcialmente los fenómenos que tienen lugar durante la respuesta anti-tumoral en este contexto, y cómo los mismos son capaces de influir en el efecto de diferentes terapias en el desarrollo tumoral. Esto es relevante para poder accionar a nivel terapéutico, favoreciendo mecanismos relevantes para la eliminación tumoral y venciendo mecanismos de resistencia que pueden ir en contra de la misma.

Los resultados obtenidos indican que la IL-17 posee roles duales en la respuesta tumoral, según el contexto en el cual se desarrolle la respuesta. En este sentido, demostramos que en un contexto de sobre-activación del inflamasoma, la IL-17 tiene un efecto anti-tumoral, que es relevante para favorecer los efectos de la terapia con anti-PD-1. Conocer esto es de fundamental importancia para desarrollar intervenciones para mejorar los efectos anti-tumorales de este tipo de terapias, ya que favoreciendo respuestas de este tipo sería posible mejorar la acción de las mismas.

Por otro lado, demostramos que la sobre-activación del inflamasoma, mediada por la delección génica de *Tmem176b* o por su inhibición farmacológica con BayK8644, genera un aumento en la expresión y actividad de IDO1 a nivel de la célula tumoral, constituyendo un mecanismo contra-regulador relevante, que sería dependiente de células T CD8<sup>+</sup>. Evidenciar este tipo de mecanismos es crucial para poder entender los fenómenos de resistencia generados durante la respuesta anti-tumoral. En nuestro caso,

conocer este mecanismo de resistencia mediado por IDO1, al parecer fundamental durante el tratamiento con BayK8644, nos permite pensar en estrategias para mejorar la efectividad de este prometedor tratamiento anti-tumoral.

## REFERENCIAS

---

- Abbasi, M. M., Helli, S., Monfaredan, A., y Jahanban-Esfahlan, R. (2015). Hesa-A Improves Clinical Outcome of Oral Carcinoma by Affecting p53 Gene Expression in vivo. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 16(10), 4169-4172. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.10.4169>
- Abbasi, M. M., Mehdipour, M., Monfaredan, A., y Jahanban-Esfahlan, R. (2015). Hesa-A Down-Regulates erb/b2 Oncogene Expression and Improves Outcome of Oral Carcinoma in a Rat Model. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(16), 6947-6951. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.16.6947>
- Adams, J. M., y Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324-1337. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210220>
- Adu-Gyamfi, C. G., Savulescu, D., George, J. A., y Suchard, M. S. (2019). Indoleamine 2, 3-Dioxygenase-Mediated Tryptophan Catabolism: A Leading Star or Supporting Act in the Tuberculosis and HIV Pas-de-Deux? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 372. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00372>
- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>
- Amicarella, F., Muraro, M. G., Hirt, C., Cremonesi, E., Padovan, E., Mele, V., Governa, V., Han, J., Huber, X., Droeser, R. A., Zuber, M., Adamina, M., Bolli, M., Rosso, R., Lugli, A., Zlobec, I., Terracciano, L., Tornillo, L., Zajac, P., ... Iezzi, G. (2017). Dual role of tumour-infiltrating T helper 17 cells in human colorectal cancer. *Gut*, 66(4), 692-704. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310016>
- Anandasabapathy, N., Feder, R., Mollah, S., Tse, S.-W., Longhi, M. P., 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. <https://doi.org/10.1084/jem.20131397>
- Ankathatti Munegowda, M., Deng, Y., Mulligan, S. J., y Xiang, J. (2011). Th17 and Th17-stimulated CD8+ T cells play a distinct role in Th17-induced preventive and therapeutic antitumor immunity. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60(10), 1473. <https://doi.org/10.1007/s00262-011-1054-y>
- Appay, V., Douek, D. C., y Price, D. A. (2008). CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nature Medicine*, 14(6), 623-628. <https://doi.org/10.1038/nm.f.1774>
- Asadzadeh, Z., Mohammadi, H., Safarzadeh, E., Hemmatzadeh, M., Mahdian-Shakib, A., Jadidi-Niaragh, F., Azizi, G., y Baradaran, B. (2017). The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. *Cellular Immunology*, 322, 15-25. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.10.015>
- Baban, B., Chandler, P. R., Sharma, M. D., Pihkala, J., Koni, P. A., Munn, D. H., y Mellor, A. L. (2009).IDO Activates Regulatory T Cells and Blocks Their Conversion into Th17-Like

T Cells. *The Journal of Immunology*, 183(4), 2475-2483. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900986>

Baghban, R., Roshangar, L., Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Ebrahimi-Kalan, A., Jaymand, M., Kolahian, S., Javaheri, T., y Zare, P. (2020). Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-0530-4>

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. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.02.013>

Baluk, P., Morikawa, S., Haskell, A., Mancuso, M., y McDonald, D. M. (2003). Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *The American Journal of Pathology*, 163(5), 1801-1815. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63540-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63540-7)

Bertram, J. S. (2000). The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 21(6), 167-223. [https://doi.org/10.1016/s0098-2997\(00\)00007-8](https://doi.org/10.1016/s0098-2997(00)00007-8)

Bhat, P., Leggatt, G., Waterhouse, N., y Frazer, I. H. (2017). Interferon- $\gamma$  derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell Death y Disease*, 8(6), e2836. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.67>

Binnewies, M., Roberts, E. W., Kersten, K., Chan, V., Fearon, D. F., Merad, M., Coussens, L. M., Gaborilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., Hedrick, C. C., Vonderheide, R. H., Pittet, M. J., Jain, R. K., Zou, W., Howcroft, T. K., Woodhouse, E. C., Weinberg, R. A., y Krummel, M. F. (2018). Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nature medicine*, 24(5), 541-550. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0014-x>

Blatner, N. R., Mulcahy, M. F., Dennis, K. L., Scholtens, D., Bentrem, D. J., Phillips, J. D., Ham, S., Sandall, B. P., Khan, M. W., Mahvi, D. M., Halverson, A. L., Stryker, S. J., Boller, A. M., Singal, A., Sneed, R. K., Sarraj, B., Ansari, M. J., Oft, M., Iwakura, Y., ... Khazaie, K. (2012). Expression of ROR $\gamma$ t marks a pathogenic regulatory T cell subset in human colon cancer. *Science Translational Medicine*, 4(164). <https://www.scholars.northwestern.edu/en/publications/expression-of-ror%CE%B3t-marks-a-pathogenic-regulatory-t-cell-subset-i>

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. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1966>

Brody, J. R., Costantino, C. L., Berger, A. C., Sato, T., Lisanti, M. P., Yeo, C. J., Emmons, R. V., y Witkiewicz, A. K. (2009). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic malignant melanoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection and affects survival. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(12), 1930-1934. <https://doi.org/10.4161/cc.8.12.8745>

Burnet, F. M. (1971). Immunological surveillance in neoplasia. *Transplantation Reviews*, 7, 3-25. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1971.tb00461.x>

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), M57-60.



Chang, S. H., y Dong, C. (2011). Signaling of Interleukin-17 family cytokines in immunity and inflammation. *Cellular signalling*, 23(7), 1069-1075. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.11.022>

Chang, S. H., Mirabolfathinejad, S. G., Katta, H., Cumpian, A. M., Gong, L., Caetano, M. S., Moghaddam, S. J., y Dong, C. (2014). T helper 17 cells play a critical pathogenic role in lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(15), 5664-5669. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319051111>

Chen, C., y Gao, F.-H. (2019). Th17 Cells Paradoxical Roles in Melanoma and Potential Application in Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00187>

Chen, P.-L., Roh, W., Reuben, A., Cooper, Z. A., Spencer, C. N., Prieto, P. A., Miller, J. P., Bassett, R. L., Gopalakrishnan, V., Wani, K., De Macedo, M. P., Austin-Breneman, J. L., Jiang, H., Chang, Q., Reddy, S. M., Chen, W.-S., Tetzlaff, M. T., Broaddus, R. J., Davies, M. A., ... Wargo, J. A. (2016). Analysis of Immune Signatures in Longitudinal Tumor Samples Yields Insight into Biomarkers of Response and Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Discovery*, 6(8), 827-837. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1545>

Chevolet, I., Speeckaert, R., Haspeslagh, M., Neyns, B., Krüse, V., Schreuer, M., Van Gele, M., Van Geel, N., y Brochez, L. (2014). Peritumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression in melanoma: An early marker of resistance to immune control? *The British Journal of Dermatology*, 171(5), 987-995. <https://doi.org/10.1111/bjd.13100>

Cho, R. W., y Clarke, M. F. (2008). Recent advances in cancer stem cells. *Current Opinion in Genetics and Development*, 18(1), 48-53. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2008.01.017>

Choe, J.-Y., Yun, J. Y., Jeon, Y. K., Kim, S. H., Park, G., Huh, J. R., Oh, S., y Kim, J. E. (2014). Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is frequently expressed in stromal cells of Hodgkin lymphoma and is associated with adverse clinical features: A retrospective cohort study. *BMC Cancer*, 14(1), 335. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-335>

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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903919106>

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. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090786>

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. <https://doi.org/10.1189/jlb.1109738>

- Coussens, L. M., Zitvogel, L., y Palucka, A. K. (2013). Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: A magic bullet? *Science (New York, N.Y.)*, 339(6117), 286-291. <https://doi.org/10.1126/science.1232227>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2011.12.006>
- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915174107>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.09.004>
- DeNardo, D. G., Andreu, P., y Coussens, L. M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Reviews*, 29(2), 309-316. <https://doi.org/10.1007/s10555-010-9223-6>
- Deng, J., Yu, X.-Q., y Wang, P.-H. (2019). Inflammasome activation and Th17 responses. *Molecular Immunology*, 107, 142-164. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.12.024>
- Dolff, S., Witzke, O., y Wilde, B. (2019). Th17 cells in renal inflammation and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 18(2), 129-136. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.08.006>
- 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. <https://doi.org/10.3109/10409238.2012.694844>
- Downs-Canner, S., Berkey, S., Delgoffe, G. M., Edwards, R. P., Curiel, T., Odunsi, K., Bartlett, D. L., y Obermayer, N. (2017). Suppressive IL-17A+Foxp3+ and ex-Th17 IL-17AnegFoxp3+ Treg cells are a source of tumour-associated Treg cells. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14649>
- 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. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
- Dunn, G. P., Old, L. J., y Schreiber, R. D. (2004a). The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology*, 22, 329-360. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803>
- Dunn, G. P., Old, L. J., y Schreiber, R. D. (2004b). The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity*, 21(2), 137-148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.012>

- Ehrlich, P., y Himmelweit, F. (1956). *The collected papers of Paul Ehrlich: In four volumes, including a complete bibliography*. Pergamon Press.
- Esfahani, K., y Miller, W. H. (2017). Reversal of Autoimmune Toxicity and Loss of Tumor Response by Interleukin-17 Blockade. *The New England Journal of Medicine*, 376(20), 1989-1991. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1703047>
- Evan, G., y Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5381), 1317-1322. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1317>
- Facciabene, A., Motz, G. T., y Coukos, G. (2012). T Regulatory Cells: Key Players in Tumor Immune Escape and Angiogenesis. *Cancer Research*, 72(9), 2162-2171. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3687>
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Fioretti, M. C., Alegre, M.-L., y Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nature Immunology*, 4(12), 1206-1212. <https://doi.org/10.1038/ni1003>
- Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B. C., Cavener, D. R., Vacca, C., Orabona, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Volpi, C., Santamaria, P., Fioretti, M. C., y Puccetti, P. (2006). The Combined Effects of Tryptophan Starvation and Tryptophan Catabolites Down-Regulate T Cell Receptor  $\zeta$ -Chain and Induce a Regulatory Phenotype in Naive T Cells. *The Journal of Immunology*, 176(11), 6752-6761. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.11.6752>
- Fife, B. T., y Bluestone, J. A. (2008). Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunological Reviews*, 224, 166-182. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00662.x>
- Forssell, J., Oberg, A., Henriksson, M. L., Stenling, R., Jung, A., y Palmqvist, R. (2007). High Macrophage Infiltration along the Tumor Front Correlates with Improved Survival in Colon Cancer. *Clinical Cancer Research*, 13(5), 1472-1479. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2073>
- Franchi, L., Eigenbrod, T., Muñoz-Planillo, R., Ozkurede, U., Kim, Y.-G., Arindam, C., Gale, M., Silverman, R. H., Colonna, M., Akira, S., y Núñez, G. (2014). Cytosolic double-stranded RNA activates the NLRP3 inflammasome via MAVS-induced membrane permeabilization and K<sup>+</sup> efflux. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 193(8), 4214-4222. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400582>
- 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.
- Friberg, M., Jennings, R., Alsarraj, M., Dessureault, S., Cantor, A., Extermann, M., Mellor, A. L., Munn, D. H., y Antonia, S. J. (2002). Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *International Journal of Cancer*, 101(2), 151-155. <https://doi.org/10.1002/ijc.10645>

- Galli, F., Aguilera, J. V., Palermo, B., Markovic, S. N., Nisticò, P., y Signore, A. (2020). Relevance of immune cell and tumor microenvironment imaging in the new era of immunotherapy. *Journal of Experimental y Clinical Cancer Research*, 39(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01586-y>
- Goldrath, A. W., y Bevan, M. J. (1999). Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature*, 402(6759), 255-262. <https://doi.org/10.1038/46218>
- Gong, T., Yang, Y., Jin, T., Jiang, W., y Zhou, R. (2018). Orchestration of NLRP3 Inflammasome Activation by Ion Fluxes. *Trends in Immunology*, 39(5), 393-406. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.01.009>
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., y Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883-899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
- 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.-I., Almeida, J. R., Darko, S., Douek, D. C., Yang, J. C., y Rosenberg, S. A. (2014). PD-1 identifies the patient-specific CD8<sup>+</sup> tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(5), 2246-2259. <https://doi.org/10.1172/JCI73639>
- 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., Toebes, M., Vesely, M. D., Lam, S. S. K., Korman, A. J., Allison, J. P., Freeman, G. J., Sharpe, A. H., Pearce, E. L., ... Schreiber, R. D. (2014). Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature*, 515(7528), 577-581. <https://doi.org/10.1038/nature13988>
- Hahn, J. N., Falck, V. G., y Jirik, F. R. (2011). Smad4 deficiency in T cells leads to the Th17-associated development of premalignant gastroduodenal lesions in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(10), 4030-4042. <https://doi.org/10.1172/JCI45114>
- Hanahan, D., y Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353-364. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80108-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80108-7)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>
- Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2017). *Biological hallmarks of cancer*. 10.
- 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., Hara, H., y Núñez, G. (2016). Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(12), 1012-1021. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.002>

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. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30624-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30624-6)

Hennequart, M., Pilotte, L., Cane, S., Hoffmann, D., Stroobant, V., Plaen, E. D., y Eynde, B. J. V. den. (2017). Constitutive IDO1 Expression in Human Tumors Is Driven by Cyclooxygenase-2 and Mediates Intrinsic Immune Resistance. *Cancer Immunology Research*, *5*(8), 695-709. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0400>

Herrera, M., Herrera, A., Domínguez, G., Silva, J., García, V., García, J. M., Gómez, I., Soldevilla, B., Muñoz, C., Provencio, M., Campos-Martin, Y., García de Herreros, A., Casal, I., Bonilla, F., y Peña, C. (2013). Cancer-associated fibroblast and M2 macrophage markers together predict outcome in colorectal cancer patients. *Cancer Science*, *104*(4), 437-444. <https://doi.org/10.1111/cas.12096>

Herrera-Rios, D., Mughal, S. S., Teuber-Hanselmann, S., Pierscianek, D., Sucker, A., Jansen, P., Schimming, T., Klode, J., Reifenberger, J., Felsberg, J., Keyvani, K., Brors, B., Sure, U., Reifenberger, G., Schadendorf, D., y Helfrich, I. (2020). Macrophages/Microglia Represent the Major Source of Indolamine 2,3-Dioxygenase Expression in Melanoma Metastases of the Brain. *Frontiers in Immunology*, *11*, 120. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00120>

Higuchi, K., y Hayaishi, O. (1967). Enzymic formation of d-kynurenine from d-tryptophan. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *120*(2), 397-403. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(67\)90256-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(67)90256-1)

Hill, M. (2006). *Contribution à la caractérisation de l'indoleamine 2,3-dioxygenase* [Tesis de Doctorado]. École doctorale chimie biologie, Université de Nantes, Francia.

Hill, M., Segovia, M., Russo, S., Girotti, M. R., y Rabinovich, G. A. (2020). The Paradoxical Roles of Inflammation during PD-1 Blockade in Cancer. *Trends in Immunology*, *41*(11), 982-993. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.09.003>

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. <https://doi.org/10.1002/eji.200636704>

Hill, R. P. (1990). Tumor progression: Potential role of unstable genomic changes. *Cancer and Metastasis Reviews*, *9*(2), 137-147. <https://doi.org/10.1007/BF00046340>

Hino, R., Kabashima, K., Kato, Y., Yagi, H., Nakamura, M., Honjo, T., Okazaki, T., y Tokura, Y. (2010). Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer*, *116*(7), 1757-1766. <https://doi.org/10.1002/cncr.24899>

Hirahara, N., Nio, Y., Sasaki, S., Takamura, M., Iguchi, C., Dong, M., Yamasawa, K., Itakura, M., y Tamura, K. (2000). Reduced invasiveness and metastasis of Chinese

hamster ovary cells transfected with human interleukin-17 gene. *Anticancer Research*, 20(5A), 3137-3142.

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. <https://doi.org/10.1084/jem.20130066>

Holtzhausen, A., Zhao, F., Evans, K. S., Tsutsui, M., Orabona, C., Tyler, D. S., y Hanks, B. A. (2015). Melanoma-Derived Wnt5a Promotes Local Dendritic-Cell Expression of IDO and Immunotolerance: Opportunities for Pharmacologic Enhancement of Immunotherapy. *Cancer Immunology Research*, 3(9), 1082-1095. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0167>

Honkanen, T. J., Tikkanen, A., Karihtala, P., Mäkinen, M., Väyrynen, J. P., y Koivunen, J. P. (2019). Prognostic and predictive role of tumour-associated macrophages in HER2 positive breast cancer. *Scientific Reports*, 9(1), 10961. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47375-2>

Honorati, M. C., Neri, S., Cattini, L., y Facchini, A. (2003). IL-17 enhances the susceptibility of U-2 OS osteosarcoma cells to NK cell lysis. *Clinical y Experimental Immunology*, 133(3), 344-349. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02234.x>

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. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.07.015>

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. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4144>

Iwata, S., Mikami, Y., Sun, H.-W., Brooks, S. R., Jankovic, D., Hirahara, K., Onodera, A., Shih, H.-Y., Kawabe, T., Jiang, K., Nakayama, T., Sher, A., O'Shea, J. J., Davis, F. P., y Kanno, Y. (2017). The Transcription Factor T-bet Limits Amplification of Type I IFN Transcriptome and Circuitry in T Helper 1 Cells. *Immunity*, 46(6), 983-991.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.05.005>

Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Banimohamad-Shotorbani, B., Jahanban-Esfahlan, A., y Yousefi, B. (2018). Combination of nanotechnology with vascular targeting agents for effective cancer therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 233(4), 2982-2992. <https://doi.org/10.1002/jcp.26051>

Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., y Zarghami, N. (2017). Tumor vascular infarction: Prospects and challenges. *International Journal of Hematology*, 105(3), 244-256. <https://doi.org/10.1007/s12185-016-2171-3>

Jiang, P., Gu, S., Pan, D., Fu, J., Sahu, A., Hu, X., Li, Z., Traugh, N., Bu, X., Li, B., Liu, J., Freeman, G. J., Brown, M. A., Wucherpfennig, K. W., y Liu, X. S. (2018). Signatures of T cell dysfunction and exclusion predict cancer immunotherapy response. *Nature Medicine*, 24(10), 1550-1558. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0136-1>

- Jin, W., y Dong, C. (2013). IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerging Microbes y Infections*, 2(1), 1-5. <https://doi.org/10.1038/emi.2013.58>
- Johansson, M., Denardo, D. G., y Coussens, L. M. (2008). Polarized immune responses differentially regulate cancer development. *Immunological Reviews*, 222, 145-154. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00600.x>
- Johansson-Percival, A., He, B., y Ganss, R. (2018). Immunomodulation of Tumor Vessels: It Takes Two to Tango. *Trends in Immunology*, 39(10), 801-814. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.08.001>
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 16(9), 582-598. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73>
- Kantono, M., y Guo, B. (2017). Inflammasomes and Cancer: The Dynamic Role of the Inflammasome in Tumor Development. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01132>
- Kloc, M., Kubiak, J. Z., Li, X. C., y Ghobrial, R. M. (2015). Pericytes, microvascular dysfunction and chronic rejection. *Transplantation*, 99(4), 658-667. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000648>
- 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. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0628>
- 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.32.19140>
- Krieg, C., Nowicka, M., Guglietta, S., Schindler, S., Hartmann, F. J., Weber, L. M., Dummer, R., Robinson, M. D., Levesque, M. P., y Becher, B. (2018). High-dimensional single-cell analysis predicts response to anti-PD-1 immunotherapy. *Nature Medicine*, 24(2), 144-153. <https://doi.org/10.1038/nm.4466>
- 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.
- Kryczek, I., Banerjee, M., Cheng, P., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., Huang, E., Finlayson, E., Simeone, D., Welling, T. H., Chang, A., Coukos, G., Liu, R., y Zou, W. (2009). Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood*, 114(6), 1141-1149. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-208249>
- Kryczek, I., Wu, K., Zhao, E., Wei, S., Vatan, L., Szeliga, W., Huang, E., Greenson, J., Chang, A., Roliński, J., Radwan, P., Fang, J., Wang, G., y Zou, W. (2011). IL-17+ regulatory T cells in the microenvironments of chronic inflammation and cancer. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 186(7), 4388-4395. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003251>

- Kuen, D.-S., Kim, B.-S., y Chung, Y. (2020). IL-17-Producing Cells in Tumor Immunity: Friends or Foes? *Immune Network*, 20(1). <https://doi.org/10.4110/in.2020.20.e6>
- Lan, C., Huang, X., Lin, S., Huang, H., Cai, Q., Wan, T., Lu, J., y Liu, J. (2013). Expression of M2-Polarized Macrophages is Associated with Poor Prognosis for Advanced Epithelial Ovarian Cancer. *Technology in Cancer Research y Treatment*, 12(3), 259-267. <https://doi.org/10.7785/tcrt.2012.500312>
- Leach, D. R., Krummel, M. F., y Allison, J. P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5256), 1734-1736.
- Lee, S. W., Kwak, H. S., Kang, M.-H., Park, Y.-Y., y Jeong, G. S. (2018). Fibroblast-associated tumour microenvironment induces vascular structure-networked tumouroid. *Scientific Reports*, 8(1), 2365. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20886-0>
- Levina, V., Su, Y., y Gorelik, E. (2012). Immunological and Nonimmunological Effects of Indoleamine 2,3-Dioxygenase on Breast Tumor Growth and Spontaneous Metastasis Formation. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2012/173029>
- Li, P., Xu, W., Liu, F., Zhu, H., Zhang, L., Ding, Z., Liang, H., y Song, J. (2021). The emerging roles of IDO2 in cancer and its potential as a therapeutic target. *Biomedicine y Pharmacotherapy*, 137, 111295. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111295>
- Li, T., Wu, B., Yang, T., Zhang, L., y Jin, K. (2020). The outstanding antitumor capacity of CD4+ T helper lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1874(2), 188439. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188439>
- 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. E., Visser, M., Stratton, M. R., Haanen, J. B. A. G., Spits, H., van der Burg, S. H., 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. <https://doi.org/10.1038/nm.3773>
- Litzenburger, U. M., Opitz, C. A., Sahm, F., Rauschenbach, K. J., Trump, S., Winter, M., Ott, M., Ochs, K., Lutz, C., Liu, X., Anastasov, N., Lehmann, I., Höfer, T., Deimling, A. von, Wick, W., y Platten, M. (2014). Constitutive IDO expression in human cancer is sustained by an autocrine signaling loop involving IL-6, STAT3 and the AHR. *Oncotarget*, 5(4), 1038-1051. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1637>
- Lotti, F., Jarrar, A. M., Pai, R. K., Hitomi, M., Lathia, J., Mace, A., Gantt, G. A., Sukhdeo, K., DeVecchio, J., Vasanji, A., Leahy, P., Hjelmeland, A. B., Kalady, M. F., y Rich, J. N. (2013). Chemotherapy activates cancer-associated fibroblasts to maintain colorectal cancer-initiating cells by IL-17A. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(13), 2851-2872. <https://doi.org/10.1084/jem.20131195>
- Louvet, C., Chiffolleau, E., Heslan, M., Tesson, L., Heslan, J.-M., Brion, R., Berioux, 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. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.01007.x>
- Lowe, S. W., Cepero, E., y Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 432(7015), 307-315. <https://doi.org/10.1038/nature03098>



- Lu, L., Pan, K., Zheng, H.-X., Li, J.-J., Qiu, H.-J., Zhao, J.-J., Weng, D.-S., Pan, Q.-Z., Wang, D.-D., Jiang, S.-S., Chang, A. E., Li, Q., y Xia, J.-C. (2013). IL-17A promotes immune cell recruitment in human esophageal cancers and the infiltrating dendritic cells represent a positive prognostic marker for patient survival. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, 36(8), 451-458. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e3182a802cf>
- Lu, Y., Hong, S., Li, H., Park, J., Hong, B., Wang, L., Zheng, Y., Liu, Z., Xu, J., He, J., Yang, J., Qian, J., y Yi, Q. (2012). Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(11), 4160-4171. <https://doi.org/10.1172/JCI65459>
- Lu, Y., Wang, Q., Xue, G., Bi, E., Ma, X., Wang, A., Qian, J., Dong, C., y Yi, Q. (2018). Th9 Cells Represent a Unique Subset of CD4+ T Cells Endowed with the Ability to Eradicate Advanced Tumors. *Cancer Cell*, 33(6), 1048-1060.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.05.004>
- Maddur, M. S., Miossec, P., Kaveri, S. V., y Bayry, J. (2012). Th17 cells: Biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *The American Journal of Pathology*, 181(1), 8-18. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.03.044>
- Mantovani, A. (2010). Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Current Molecular Medicine*, 10(4), 369-373.
- Mantovani, Alberto, Allavena, P., Sica, A., y Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), 436-444. <https://doi.org/10.1038/nature07205>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nature04515>
- Martin-Orozco, N., Muranski, P., Chung, Y., Yang, X. O., Yamazaki, T., Lu, S., Hwu, P., Restifo, N. P., Overwijk, W. W., y Dong, C. (2009). T Helper 17 Cells Promote Cytotoxic T Cell Activation in Tumor Immunity. *Immunity*, 31(5), 787-798. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.014>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01149.x>
- McGeachy, M. J., Bak-Jensen, K. S., Chen, Y., Tato, C. M., Blumenschein, W., McClanahan, T., y Cua, D. J. (2007). TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nature Immunology*, 8(12), 1390-1397. <https://doi.org/10.1038/ni1539>
- Meireson, A., Devos, M., y Brochez, L. (2020). IDO Expression in Cancer: Different Compartment, Different Functionality? *Frontiers in Immunology*, 11, 531491. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.531491>
- Melssen, M., y Slingluff, C. L. (2017). Vaccines targeting helper T cells for cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology*, 47, 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.07.004>

- Metz, R., DuHadaway, J. B., Kamasani, U., Laury-Kleintop, L., Muller, A. J., y Prendergast, G. C. (2007). Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer Research*, 67(15), 7082-7087. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1872>
- Metz, R., Rust, S., DuHadaway, J. B., Mautino, M. R., Munn, D. H., Vahanian, N. N., Link, C. J., y Prendergast, G. C. (2012). IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: A novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. *Oncotmunology*, 1(9), 1460-1468. <https://doi.org/10.4161/onci.21716>
- Miller, B. C., Sen, D. R., Al Abosy, R., Bi, K., Virkud, Y. V., LaFleur, M. W., Yates, K. B., Lako, A., Felt, K., Naik, G. S., Manos, M., Gjini, E., Kuchroo, J. R., Ishizuka, J. J., Collier, J. L., Griffin, G. K., Maleri, S., Comstock, D. E., Weiss, S. A., ... Haining, W. N. (2019). Subsets of exhausted CD8+ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nature Immunology*, 20(3), 326-336. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0312-6>
- Muller, A. J., DuHadaway, J. B., Donover, P. S., Sutanto-Ward, E., y Prendergast, G. C. (2005). Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nature Medicine*, 11(3), 312-319. <https://doi.org/10.1038/nm1196>
- Muller, A. J., Manfredi, M. G., Zakharia, Y., y Prendergast, G. C. (2019). Inhibiting IDO pathways to treat cancer: Lessons from the ECHO-301 trial and beyond. *Seminars in Immunopathology*, 41(1), 41-48. <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0702-0>
- Munn, D. H. (2004). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *Journal of Clinical Investigation*, 114(2), 280-290. <https://doi.org/10.1172/JCI200421583>
- 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 (New York, N.Y.)*, 281(5380), 1191-1193.
- Munn, D. 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. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.03.013>
- Muranski, P., Boni, A., Antony, P. A., Cassard, L., Irvine, K. R., Kaiser, A., Paulos, C. M., Palmer, D. C., Touloukian, C. E., Ptak, K., Gattinoni, L., Wrzesinski, C., Hinrichs, C. S., Kerstann, K. W., Feigenbaum, L., Chan, C.-C., y Restifo, N. P. (2008). Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood*, 112(2), 362-373. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-120998>
- Muranski, P., y Restifo, N. P. (2013). Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood*, 121(13), 2402-2414. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-378653>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nrc2444>
- Murugaiyan, G., y Saha, B. (2009). Protumor vs Antitumor Functions of IL-17. *The Journal of Immunology*, 183(7), 4169-4175. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901017>

- Na, L., Y, S., D, Q., y Mf, C. (2007). *The biology of cancer stem cells*. Annual Review of Cell and Developmental Biology; Annu Rev Cell Dev Biol. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104154>
- Noonan, K., Marchionni, L., Anderson, J., Pardoll, D., Roodman, G. D., y Borrello, I. (2010). A novel role of IL-17-producing lymphocytes in mediating lytic bone disease in multiple myeloma. *Blood*, 116(18), 3554-3563. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-283895>
- Nouël, A., Pochard, P., Simon, Q., Ségalen, I., Le Meur, Y., Pers, J. O., y Hillion, S. (2015). B-Cells induce regulatory T cells through TGF- $\beta$ /IDO production in A CTLA-4 dependent manner. *Journal of Autoimmunity*, 59, 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.02.004>
- 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. <https://doi.org/10.1111/cas.12394>
- Palucka, A. K., y Coussens, L. M. (2016). The Basis of Oncoimmunology. *Cell*, 164(6), 1233-1247. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.049>
- Pan, B., Shen, J., Cao, J., Zhou, Y., Shang, L., Jin, S., Cao, S., Che, D., Liu, F., y Yu, Y. (2015). Interleukin-17 promotes angiogenesis by stimulating VEGF production of cancer cells via the STAT3/GIV signaling pathway in non-small-cell lung cancer. *Scientific Reports*, 5(1), 16053. <https://doi.org/10.1038/srep16053>
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 252-264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>
- Pauken, K. E., y Wherry, E. J. (2015). Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends in Immunology*, 36(4), 265-276. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.02.008>
- Piccirillo, C. A., y Shevach, E. M. (2004). Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: Central players in the arena of peripheral tolerance. *Seminars in Immunology*, 16(2), 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2003.12.003>
- Platten, M., Nollen, E. A. A., Röhrig, U. F., Fallarino, F., y Opitz, C. A. (2019). Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 18(5), 379-401. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0016-5>
- Poschke, I., Mougiakakos, D., y Kiessling, R. (2011). Camouflage and sabotage: Tumor escape from the immune system. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 60(8), 1161-1171. <https://doi.org/10.1007/s00262-011-1012-8>
- Prendergast, G. C., Malachowski, W. J., Mondal, A., Scherle, P., y Muller, A. J. (2018). Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Its Therapeutic Inhibition in Cancer. En *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 336, pp. 175-203). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.07.004>

- Prendergast, G. C., Metz, R., Muller, A. J., Merlo, L. M. F., y Mandik-Nayak, L. (2014). IDO2 in Immunomodulation and Autoimmune Disease. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00585>
- Punkenburg, E., Vogler, T., Büttner, M., Amann, K., Waldner, M., Atreya, R., Abendroth, B., Mudter, J., Merkel, S., Gallmeier, E., Rose-John, S., Neurath, M. F., y Hildner, K. (2016). Batf-dependent Th17 cells critically regulate IL-23 driven colitis-associated colon cancer. *Gut*, 65(7), 1139-1150. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308227>
- Qian, B., y Pollard, J. W. (2010). Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell*, 141(1), 39-51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.014>
- Qian, X., Chen, H., Wu, X., Hu, L., Huang, Q., y Jin, Y. (2017). Interleukin-17 acts as double-edged sword in anti-tumor immunity and tumorigenesis. *Cytokine*, 89, 34-44. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.09.011>
- 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 (Baltimore, Md.: 1950)*, 155(3), 1151-1164.
- Salazar, N., y Zabel, B. A. (2019). Support of Tumor Endothelial Cells by Chemokine Receptors. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00147>
- Schäfer, M., y Werner, S. (2008). Cancer as an overheating wound: An old hypothesis revisited. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(8), 628-638. <https://doi.org/10.1038/nrm2455>
- Schroder, K., y Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. *Cell*, 140(6), 821-832. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040>
- Segovia, M., Louvet, C., Charnet, P., Savina, A., Tilly, G., Gautreau, L., Carretero-Iglesia, L., Beriou, G., Cebrian, I., Cens, T., Hepburn, L., Chiffoleau, E., Floto, R. A., Anegón, 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. <https://doi.org/10.1111/ajt.12708>
- Segovia, M., Russo, S., Jeldres, M., Mahmoud, Y. D., Perez, V., Duhalde, M., Charnet, P., Rousset, M., Victoria, S., Veigas, F., Louvet, C., Vanhove, B., Floto, R. A., Anegón, I., Cuturi, M. C., Girotti, M. R., Rabinovich, G. A., y Hill, M. (2019). Targeting TMEM176B Enhances Antitumor Immunity and Augments the Efficacy of Immune Checkpoint Blockers by Unleashing Inflammasome Activation. *Cancer Cell*, 35(5), 767-781.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.04.003>
- Sharma, M. D., Baban, B., Chandler, P., Hou, D.-Y., Singh, N., Yagita, H., Azuma, M., Blazar, B. R., Mellor, A. L., y Munn, D. H. (2007). Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *Journal of Clinical Investigation*, 117(9), 2570-2582. <https://doi.org/10.1172/JCI31911>
- Sharma, P., y Allison, J. P. (2015). Immune Checkpoint Targeting in Cancer Therapy: Toward Combination Strategies with Curative Potential. *Cell*, 161(2), 205-214. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.030>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.017>
- 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.
- Siddiqui, I., Schaeuble, K., Chennupati, V., Fuertes Marraco, S. A., Calderon-Copete, S., Pais Ferreira, D., Carmona, S. J., Scarpellino, L., Gfeller, D., Pradervand, S., Luther, S. A., Speiser, D. E., y Held, W. (2019). Intratumoral Tcf1+PD-1+CD8+ T Cells with Stem-like Properties Promote Tumor Control in Response to Vaccination and Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Immunity*, 50(1), 195-211.e10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.12.021>
- Smith, C., Chang, M. Y., Parker, K. H., Beury, D. W., DuHadaway, J. B., Flick, H. E., Boulden, J., Sutanto-Ward, E., Soler, A. P., Laury-Kleintop, L. D., Mandik-Nayak, L., Metz, R., Ostrand-Rosenberg, S., Prendergast, G. C., y Muller, A. J. (2012). IDO Is a Nodal Pathogenic Driver of Lung Cancer and Metastasis Development. *Cancer Discovery*, 2(8), 722-735. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0014>
- Spranger, S., Koblish, H. K., Horton, B., Scherle, P. A., Newton, R., y Gajewski, T. F. (2014). Mechanism of tumor rejection with doublets of CTLA-4, PD-1/PD-L1, or IDO blockade involves restored IL-2 production and proliferation of CD8+ T cells directly within the tumor microenvironment. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2(1), 3. <https://doi.org/10.1186/2051-1426-2-3>
- Sprooten, J., Ceusters, J., Coosemans, A., Agostinis, P., De Vleeschouwer, S., Zitvogel, L., Kroemer, G., Galluzzi, L., y Garg, A. D. (2019). Trial watch: Dendritic cell vaccination for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*, 8(11). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1638212>
- Steinman, R. M. (2012). Decisions About Dendritic Cells: Past, Present, and Future. *Annual Review of Immunology*, 30(1), 1-22. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-100311-102839>
- Stockinger, B., y Omenetti, S. (2017). The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nature Reviews. Immunology*, 17(9), 535-544. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.50>
- Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E., y Flavell, R. (2012). Inflammasomes in health and disease. *Nature*, 481(7381), 278-286. <https://doi.org/10.1038/nature10759>
- Su, X., Ye, J., Hsueh, E. C., Zhang, Y., Hoft, D. F., y Peng, G. (2010). Tumor Microenvironments Direct the Recruitment and Expansion of Human Th17 Cells. *The Journal of Immunology*, 184(3), 1630-1641. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902813>
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T. W., y Sakaguchi, S. (2000). Immunologic Self-Tolerance Maintained by Cd25+Cd4+Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(2), 303-310.
- 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.

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. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0137>

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. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.001>

Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., Berger, A., Bruneval, P., Fridman, W.-H., Pagès, F., y Galon, J. (2011). Clinical Impact of Different Classes of Infiltrating T Cytotoxic and Helper Cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Research*, 71(4), 1263-1271. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2907>

Tran, E., Turcotte, S., Gros, A., Robbins, P. F., Lu, Y.-C., Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Somerville, R. P., Hogan, K., Hinrichs, 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 (New York, N.Y.)*, 344(6184), 641-645. <https://doi.org/10.1126/science.1251102>

Tsutsui, S., Yasuda, K., Suzuki, K., Tahara, K., Higashi, H., y Era, S. (2005). Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: The relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.14.2.425>

Uchiyama, R., Yonehara, S., Taniguchi, S., Ishido, S., Ishii, K. J., y Tsutsui, H. (2017). Inflammasome and Fas-Mediated IL-1 $\beta$  Contributes to Th17/Th1 Cell Induction in Pathogenic Bacterial Infection In Vivo. *The Journal of Immunology*, 199(3), 1122-1130. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601373>

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. <https://doi.org/10.1038/nm934>

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. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0095>

Vogelstein, B., y Kinzler, K. W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics: TIG*, 9(4), 138-141. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(93\)90209-z](https://doi.org/10.1016/0168-9525(93)90209-z)

W, Stewart B, Stewart, B. W., Wild, C., International Agency for Research on Cancer, y World Health Organization. (2014). *World cancer report 2014*.

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, K., Kim, M. K., Di Caro, G., Wong, J., Shalapour, S., Wan, J., Zhang, W., Zhong, Z., Sanchez-Lopez, E., Wu, L.-W., Taniguchi, K., Feng, Y., Fearon, E., Grivnenikov, S. I., y Karin, M. (2014). Interleukin-17 receptor a signaling in transformed enterocytes promotes early colorectal tumorigenesis. *Immunity*, 41(6), 1052-1063. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.11.009>

Wang, L., Yi, T., Kortylewski, M., Pardoll, D. M., Zeng, D., y Yu, H. (2009). IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(7), 1457-1464. <https://doi.org/10.1084/jem.20090207>

Wei, S. C., Duffy, C. R., y Allison, J. P. (2018). Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discovery*, 8(9), 1069-1086. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0367>

Wu, X., Tian, J., y Wang, S. (2018). Insight Into Non-Pathogenic Th17 Cells in Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01112>

Ye, Z., Yue, L., Shi, J., Shao, M., y Wu, T. (2019). Role of IDO and TDO in Cancers and Related Diseases and the Therapeutic Implications. *Journal of Cancer*, 10(12), 2771-2782. <https://doi.org/10.7150/jca.31727>

Yu, Z., Pestell, T. G., Lisanti, M. P., y Pestell, R. G. (2012). Cancer Stem Cells. *The international journal of biochemistry y cell biology*, 44(12), 2144-2151. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.08.022>

Zhang, H., Wang, X., Shen, Z., Xu, J., Qin, J., y Sun, Y. (2015). Infiltration of diametrically polarized macrophages predicts overall survival of patients with gastric cancer after surgical resection. *Gastric Cancer*, 18(4), 740-750. <https://doi.org/10.1007/s10120-014-0422-7>

Zhang, L., Conejo-Garcia, J. R., Katsaros, D., Gimotty, P. A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M. N., Rubin, S. C., y Coukos, G. (2003). Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *The New England Journal of Medicine*, 348(3), 203-213. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020177>

Zhang, Z., Liu, S., Zhang, B., Qiao, L., Zhang, Y., y Zhang, Y. (2020). T Cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00017>

Zhao, Y., Yang, W., Huang, Y., Cui, R., Li, X., y Li, B. (2018). Evolving Roles for Targeting CTLA-4 in Cancer Immunotherapy. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 47(2), 721-734. <https://doi.org/10.1159/000490025>

Zhiyu, W., Wang, N., Wang, Q., Peng, C., Zhang, J., Liu, P., Ou, A., Zhong, S., Cordero, M. D., y Lin, Y. (2016). The inflammasome: An emerging therapeutic oncotarget for cancer prevention. *Oncotarget*, 7(31), 50766-50780. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9391>

Zhu, J., y Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: Fates, functions, and faults. *Blood*, 112(5), 1557-1569. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-078154>

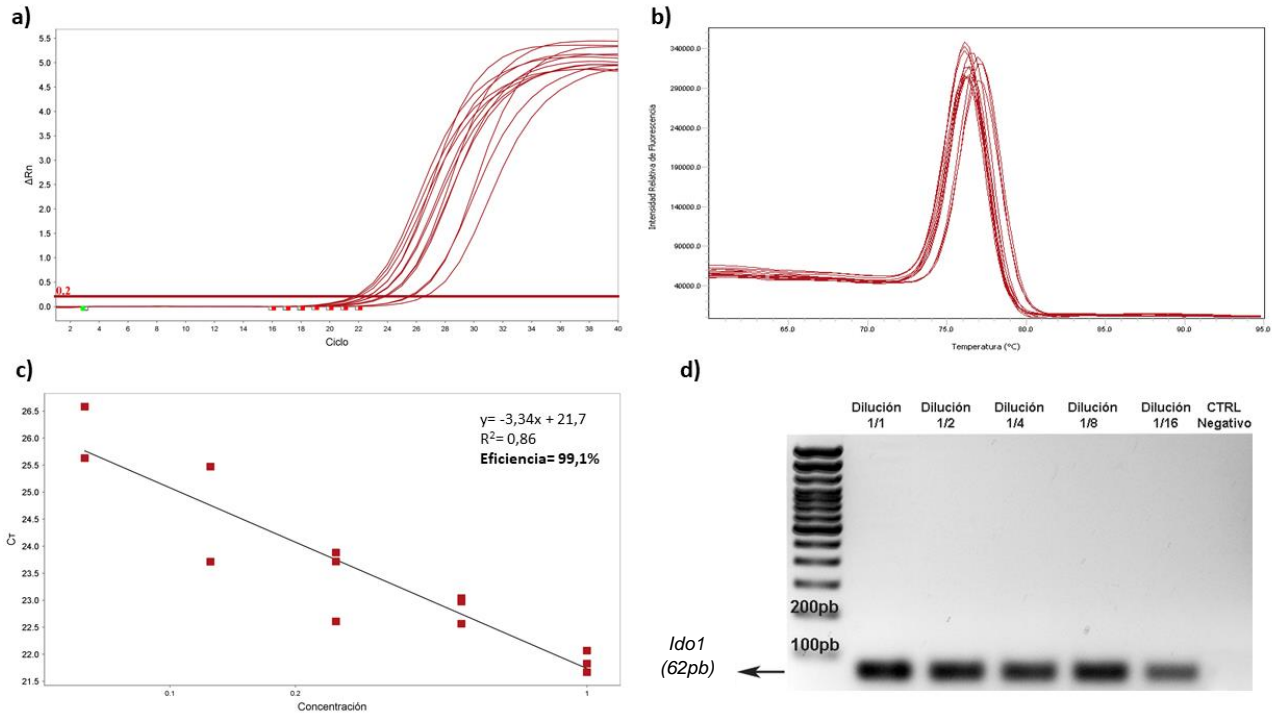
Zou, W., y Chen, L. (2008). Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nature Reviews. Immunology*, 8(6), 467-477. <https://doi.org/10.1038/nri2326>

Zou, W., y Restifo, N. P. (2010). T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology*, 10(4), 248-256. <https://doi.org/10.1038/nri2742>

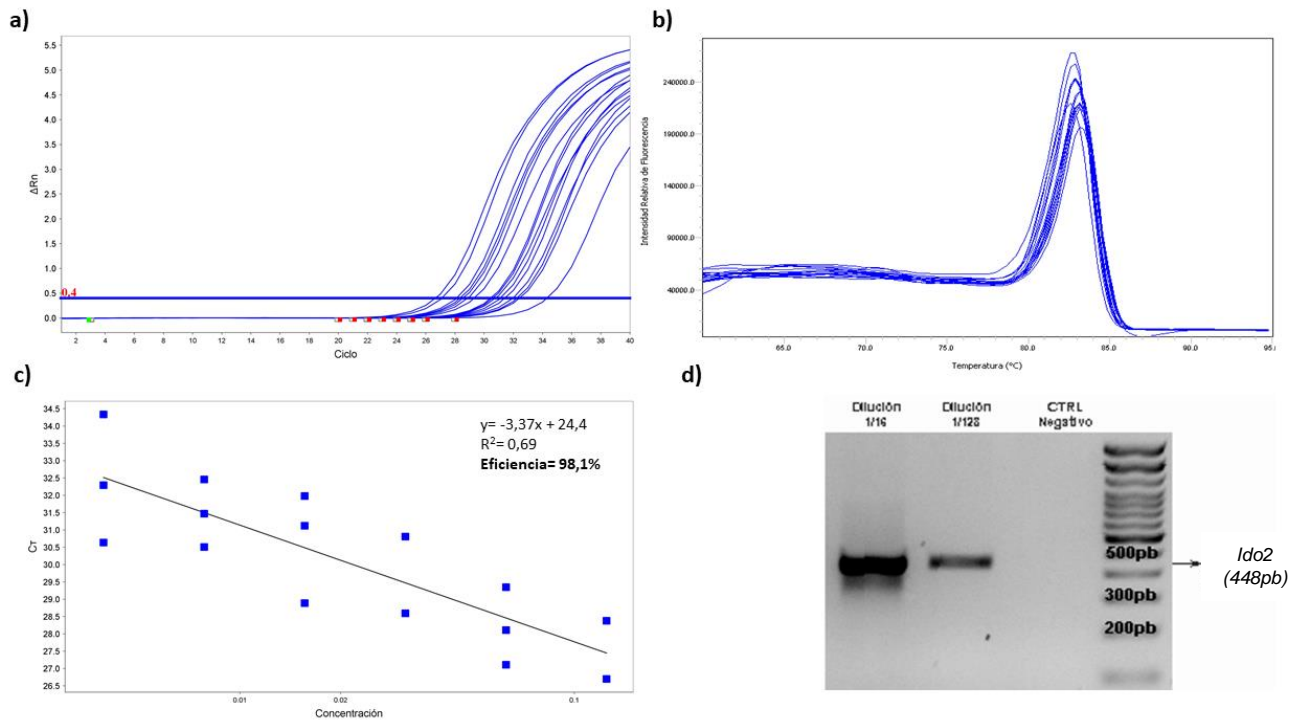


# ANEXO

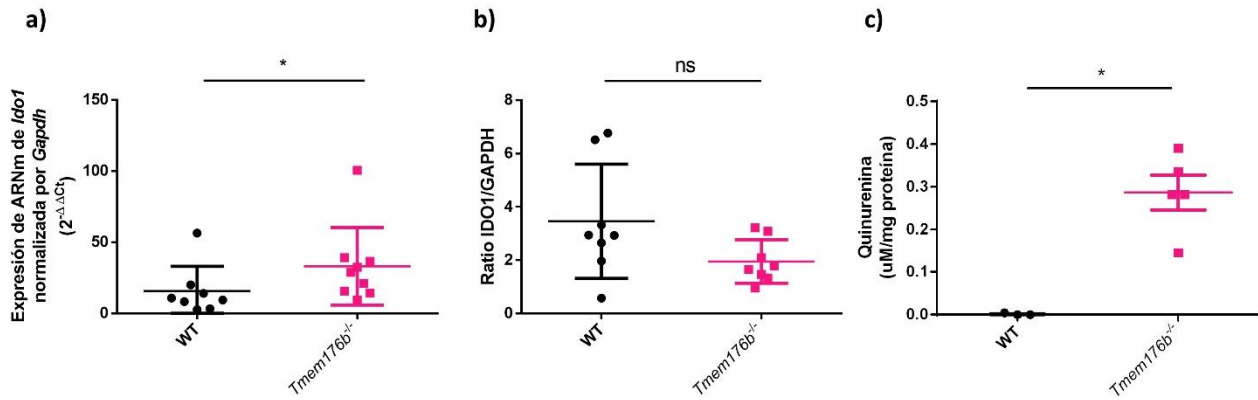
## Anexo 1: Figuras Suplementarias



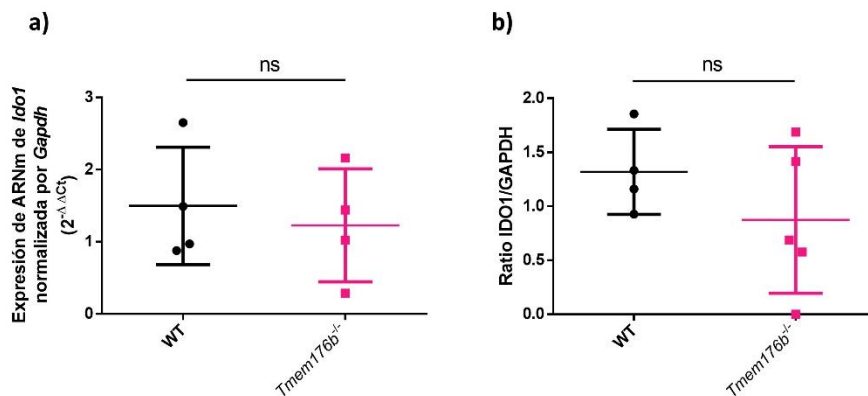
**Figura S1. Evaluación de la eficiencia de los cebadores utilizados para la amplificación de *Idol1* mediante RT-qPCR.** a y b) Curvas de amplificación (a) y *melting* (b) de *Idol1* para cinco diluciones seriadas al medio de ADNc (comenzando en una dilución 1/1), obtenido a partir de tumores de ratones inyectados con células EG7-OVA. c) Gráfica del  $C_t$  respecto a la concentración del ADNc, utilizada para la determinación de la eficiencia de amplificación de los cebadores utilizados; se muestra la ecuación de la recta, el índice de correlación ( $R^2$ ) y la eficiencia obtenida. d) Gel de agarosa al 2% del producto de la qPCR de las cinco diluciones seriadas de ADNc, para evaluar la correcta obtención del amplicón de interés; se muestra el tamaño del amplicón obtenido. Utilizamos un marcador de peso molecular de ADN de 100pb (Invitrogen).



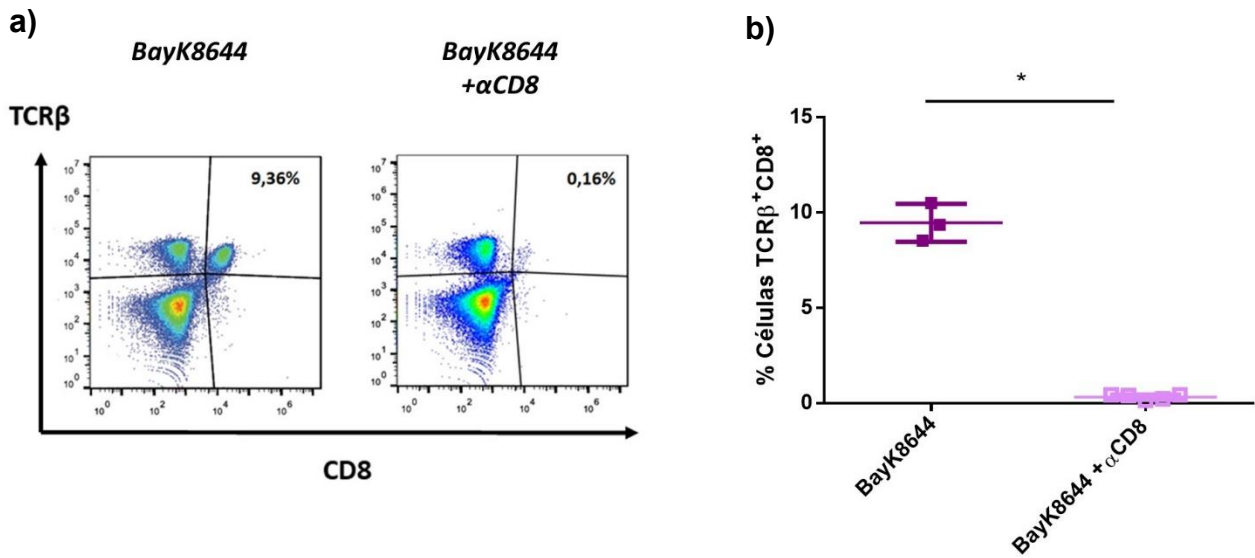
**Figura S2. Evaluación de la eficiencia de los cebadores utilizados para la amplificación de *Ido2* mediante RT-qPCR.** a y b) Curvas de amplificación (a) y *melting* (b) de *Ido2* para seis diluciones seriadas al medio de ADNc (comenzando en una dilución 1/8), obtenido a partir de hígados de ratones C57/BL6. c) Gráfica del  $C_t$  respecto a la concentración del ADNc, utilizada para la determinación de la eficiencia de amplificación de los cebadores utilizados; se muestra la ecuación de la recta, el índice de correlación ( $R^2$ ) y la eficiencia obtenida. d) Gel de agarosa al 2% del producto de la qPCR de dos de las diluciones seriadas de ADNc, para evaluar la correcta obtención del amplicón de interés; se muestra el tamaño del amplicón obtenido. Utilizamos un marcador de peso molecular de ADN de 100pb (Invitrogen).



**Figura S3. Expresión y actividad enzimática de IDO1 en tumores EG7-OVA de animales WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup>.** a) Expresión de ARNm de *Ido1* normalizada por *Gapdh*, ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ), evaluada mediante RT-qPCR. b) Expresión de IDO1 a nivel proteico, normalizada por GAPDH (ratio IDO1/GAPDH), analizada mediante Western Blot. c) Producción de quinurenina analizada por el método del Reactivo de Ehrlich. Las muestras se obtuvieron a partir de tumores de ratones WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup>; inoculados con células tumorales EG7-OVA. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes, realizados durante mi tesina de grado. ns (no significativo): p-valor>0,05; \*: p-valor<0,05.



**Figura S4. Expresión de IDO1 en ganglios linfáticos drenantes de tumores EG7-OVA de animales WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup>.** a) Expresión de ARNm de *Ido1* normalizada por *Gapdh*, ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) evaluada mediante RT-qPCR. b) Expresión de IDO1 a nivel proteico, normalizada por GAPDH (ratio IDO1/GAPDH) analizada mediante Western Blot. Las muestras se obtuvieron a partir de ganglios linfáticos drenantes de tumor de ratones WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup>; inoculados con células tumorales EG7-OVA. Los resultados corresponden a un experimento, realizado durante mi tesina de grado. ns (no significativo): p-valor>0,05.



**Figura S5. Evaluación de la depleción de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en el bazo de animales tratados con BayK8644.** a) Estrategia de *gating* utilizada. b) Porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> (TCRβ<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) presentes en el bazo de animales inoculados con células EG7-OVA, y tratados con BayK8644 (1mg/kg), con o sin tratamiento anti-CD8 (100μg/ratón) cada 3 días. Los resultados corresponden a un experimento. \* p-valor<0,05.

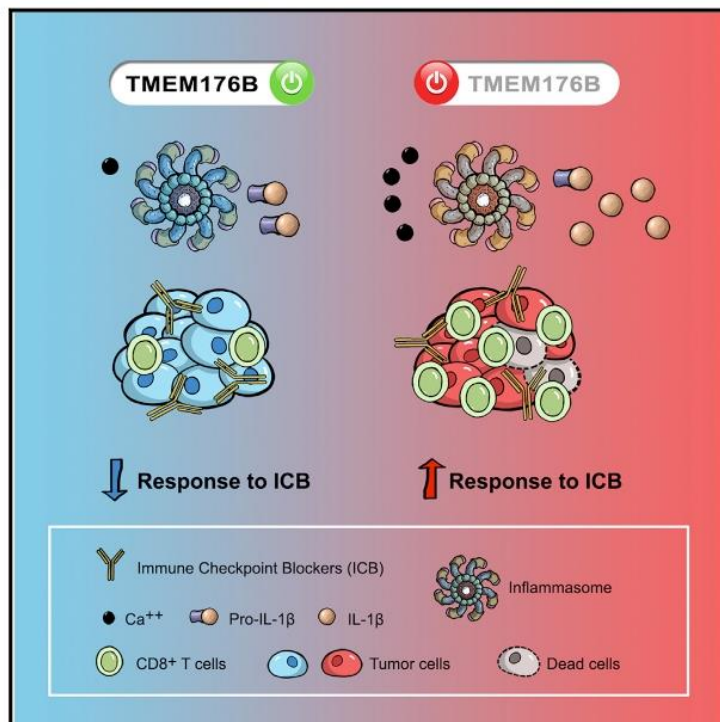
# Anexo 2: Targeting TMEM176B Enhances Antitumor Immunity and Augments the Efficacy of Immune Checkpoint Blockers by Unleashing Inflammasome Activation

Article

## Cancer Cell

### Targeting TMEM176B Enhances Antitumor Immunity and Augments the Efficacy of Immune Checkpoint Blockers by Unleashing Inflammasome Activation

#### Graphical Abstract



#### Authors

Mercedes Segovia, Sofia Russo, Mathias Jeldres, ..., M. Romina Girotti, Gabriel A. Rabinovich, Marcelo Hill

#### Correspondence

ccuturi@nantes.inserm.fr (M.C.C.), mhill@pasteur.edu.uy (M.H.)

#### In Brief

Segovia et al. show that TMEM176B inhibits inflammasome activation and IL-1β cleavage by controlling cytosolic Ca<sup>2+</sup> in dendritic cells and macrophages. Inhibition of TMEM176B enhances tumor infiltration by CD8<sup>+</sup> T cells and improves the antitumor activity of immune checkpoint blockers.

#### Highlights

- TMEM176B inhibits the NLRP3 inflammasome by controlling cytosolic Ca<sup>2+</sup>.
- Lack of *Tmem176b* enhances antitumor immunity via the caspase-1/IL-1β pathway
- Human tumors responding to immune checkpoint blockade display an inflammasome-activated signature
- A TMEM176B inhibitor improves the antitumor activity of immune checkpoint blockade



# Targeting TMEM176B Enhances Antitumor Immunity and Augments the Efficacy of Immune Checkpoint Blockers by Unleashing Inflammasome Activation

Mercedes Segovia,<sup>1,2,9</sup> Sofia Russo,<sup>1,2,9</sup> Mathias Jeldres,<sup>1</sup> Yamil D. Mahmoud,<sup>3</sup> Valentina Perez,<sup>1,2</sup> Maite Duhalde,<sup>1</sup> Pierre Charnet,<sup>4</sup> Matthieu Rousset,<sup>4</sup> Sabina Victoria,<sup>1</sup> Florencia Veigas,<sup>3</sup> Cédric Louvet,<sup>5</sup> Bernard Vanhove,<sup>5,6</sup> R. Andrés Floto,<sup>7</sup> Ignacio Anegón,<sup>5</sup> Maria Cristina Cuturi,<sup>5,10,\*</sup> M. Romina Girotti,<sup>3,10</sup> Gabriel A. Rabinovich,<sup>3,8,10</sup> and Marcelo Hill<sup>1,2,10,11,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Immunoregulation and Inflammation, Institut Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup>Immunobiology Department, Faculty of Medicine, University of the Republic, 11800 Montevideo, Uruguay

<sup>3</sup>Laboratories of Immunopathology and Translational Immuno-Oncology, Institute of Biology and Experimental Medicine (IBYME), National Council of Scientific and Technical Investigations (CONICET), C1428 Buenos Aires, Argentina

<sup>4</sup>Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247, CNRS ENSCM, Université de Montpellier, 34093 Montpellier, France

<sup>5</sup>INSERM UMR 1064, Center for Research in Transplantation and Immunology, Université de Nantes, CHU Nantes, Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), 44093 Nantes, France

<sup>6</sup>Xenothera, 44093 Nantes, France

<sup>7</sup>Molecular Immunity Unit, Department of Medicine, University of Cambridge, CB2 0QH Cambridge, UK

<sup>8</sup>Department of Biological Chemistry, School of Exact and Natural Sciences, University of Buenos Aires, C1428 Buenos Aires, Argentina

<sup>9</sup>These authors contributed equally

<sup>10</sup>These authors contributed equally

<sup>11</sup>Lead Contact

\*Correspondence: [ccuturi@nantes.inserm.fr](mailto:ccuturi@nantes.inserm.fr) (M.C.C.), [mhill@pasteur.edu.uy](mailto:mhill@pasteur.edu.uy) (M.H.)

<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.04.003>

## SUMMARY

Although immune checkpoint blockers have yielded significant clinical benefits in patients with different malignancies, the efficacy of these therapies is still limited. Here, we show that disruption of transmembrane protein 176B (TMEM176B) contributes to CD8<sup>+</sup> T cell-mediated tumor growth inhibition by unleashing inflammasome activation. Lack of *Tmem176b* enhances the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies through mechanisms involving caspase-1/IL-1 $\beta$  activation. Accordingly, patients responding to checkpoint blockade therapies display an activated inflammasome signature. Finally, we identify BayK8644 as a potent TMEM176B inhibitor that promotes CD8<sup>+</sup> T cell-mediated tumor control and reinforces the antitumor activity of both anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies. Thus, pharmacologic de-repression of the inflammasome by targeting TMEM176B may enhance the therapeutic efficacy of immune checkpoint blockers.

## INTRODUCTION

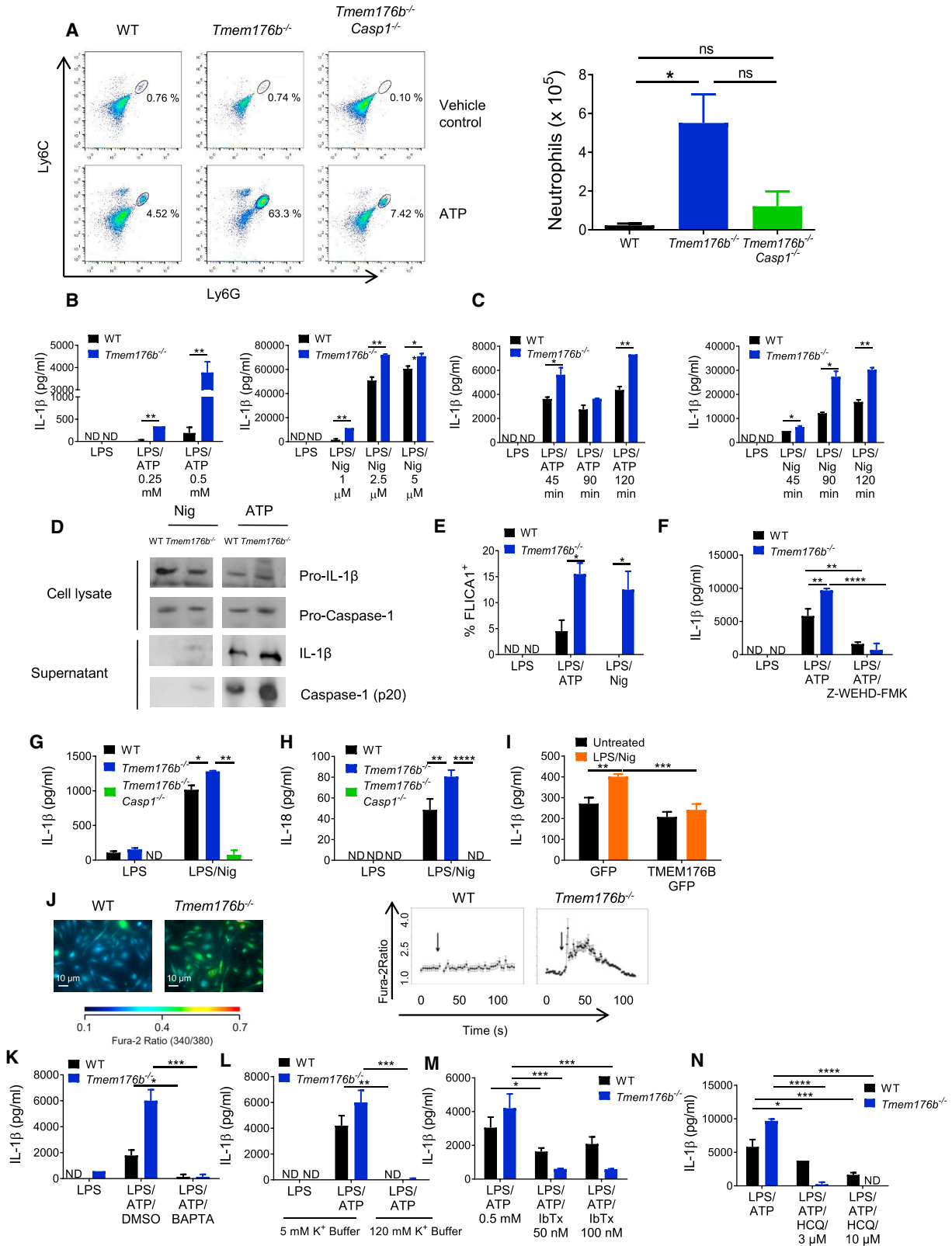
Blockade of immune checkpoints, including the cytotoxic T lymphocyte-associated protein (CTLA)-4 and the programmed cell death-1 (PD-1)/PD ligand-1 (PD-L1) pathway, have increased overall survival and progression-free survival of cancer patients.

However, only a restricted number of patients show clinical benefits (Syn et al., 2017; Binnewies et al., 2018), suggesting that other immune inhibitory mechanisms may limit the efficacy of these treatments. In this regard, high intratumoral K<sup>+</sup> leads to T cell dysfunction by inhibiting voltage and Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels expressed in antitumoral T lymphocytes (Eil et al.,

### Significance

Therapies targeting immune checkpoint pathways have revolutionized treatment of several cancers. However, innate and adaptive mechanisms may limit the clinical efficacy of this therapeutic modality. Here, we identify the transmembrane protein 176B (TMEM176B) as an innate immune checkpoint that curtails CD8<sup>+</sup> T cell-mediated immunity by repressing inflammasome activation. Genetic disruption or pharmacologic inhibition of TMEM176B potentiates antitumor immunity and enhances the efficacy of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies in mice by unleashing inflammasome activation. Accordingly, an activated inflammasome signature delineates favorable clinical responses in patients receiving immune checkpoint blockers. Thus, targeting TMEM176B may influence antitumor effector mechanisms by de-repressing inflammasome activation.





(legend on next page)

2016), suggesting a role for ionic channels as regulatory checkpoints and therapeutic targets to reinforce antitumor immunity.

Recognition of immunogenic tumors by innate immune sensors including the TMEM173 (STING) type I interferon pathway leads to stimulation of CD8<sup>+</sup> T cell-mediated immunity and potentiation of CTLA-4- and PD-1-targeted therapies (Woo et al., 2014). Within the human myeloid compartment, STING controls the NLRP3 inflammasome (Gaidt et al., 2017), a cytosolic multiprotein complex that, once activated, cleaves caspase-1, which then processes pro-interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and pro-IL-18 to give the active and secreted forms of these pro-inflammatory cytokines (Rathinam and Fitzgerald, 2016). Altered levels of cytosolic cations have been shown to control secretion of active IL-1 $\beta$  through modulation of inflammasome activation (Gong et al., 2018). Interestingly, activation of the NLRP3 inflammasome following immunogenic chemotherapy sensitizes tumors to immune checkpoint blockers (Pfirschke et al., 2016). However, the role of the NLRP3 inflammasome in modulating checkpoint blockade therapies has not yet been explored.

Transmembrane protein 176B (TMEM176B), also known as tolerance-related and induced (TORID), has been identified as an immunoregulatory cation channel (Louvet et al., 2005; Segovia et al., 2014). This ubiquitously expressed protein contains four transmembrane domains and an ITIM motif in its C terminus (Eon Kuek et al., 2016). TMEM176B and its homologous TMEM176A are members of the CD20-like MS4A family of proteins (Eon Kuek et al., 2016; Louvet et al., 2005) and are highly expressed in monocytes, macrophages, and CD11b<sup>+</sup> dendritic cells (DCs) (Condamine et al., 2010). Here we explored the role of TMEM176B in inflammasome regulation, T cell-dependent anti-tumor immunity and response to immune checkpoint blockade therapies.

## RESULTS

### TMEM176B Inhibits Activation of the NLRP3 Inflammasome

To investigate whether TMEM176B regulates inflammasome activation, we injected ATP in wild-type (WT) or *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice (Figure 1A). In this model, neutrophil recruitment to the peritoneal cavity relies on caspase-1/11 activation (Schroeder et al., 2017). We observed that *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice recruited significantly more neutrophils than WT animals. To determine whether increased neutrophil recruitment upon ATP injection was dependent on inflammasome activation, we generated *Tmem176b*<sup>-/-</sup>*Casp1*<sup>-/-</sup> double knockout (DKO) mice (Figure S1A). Peritoneal neutrophil recruitment was almost completely inhibited in *Tmem176b*<sup>-/-</sup>*Casp1*<sup>-/-</sup> compared with *Tmem176b*<sup>-/-</sup> animals (Figure 1A). ATP-induced neutrophil recruitment in *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice was also interrupted by injection of a caspase-1 inhibitor (Figure S1B). We then stimulated WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> bone marrow-derived DCs (BMDCs) with the well-established NLRP3 activators ATP and nigericin and determined IL-1 $\beta$  in culture supernatants as a readout of inflammasome activation. We observed that, for both stimuli, *Tmem176b*<sup>-/-</sup> BMDCs secreted significantly higher levels of IL-1 $\beta$  than WT DCs in a dose- and time-dependent manner (Figures 1B and 1C). Similar findings were observed when we stimulated BMDCs with aluminum particles (Figure S1C). Western blot studies confirmed that the mature (cleaved) form of IL-1 $\beta$  was more abundant in culture supernatants from *Tmem176b*<sup>-/-</sup> BMDCs compared with those obtained from WT cells (Figure 1D). Moreover, we observed increased mature caspase-1 in supernatants from *Tmem176b*<sup>-/-</sup> BMDCs compared with WT cells when stimulated with ATP (Figure 1D). Although lower doses (2.5  $\mu$ M) of nigericin induced expression of

#### Figure 1. The Ionic Channel TMEM176B Inhibits the NLRP3 Inflammasome

(A) Representative dot plots and absolute number of neutrophils (CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>int</sup> Ly6G<sup>+</sup>) in peritoneal lavage 4 h after intraperitoneal (i.p.) injection with vehicle control (PBS) or 20 mg/kg ATP. In the plots, CD11b<sup>+</sup> cells were analyzed for Ly6C and Ly6G expression. At least six animals were studied in each group in two independent experiments. ns, not significant; \*p < 0.05; one-way ANOVA test.

(B and C) Dose-response (B) and time-response (C) analysis of WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> bone marrow-derived DCs (BMDCs) treated with LPS (0.25  $\mu$ g/mL) for 4 h, washed and treated with ATP (left) or nigericine (Nig) (right). IL-1 $\beta$  in culture supernatants was determined by ELISA. One experiment representative of five is shown. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01; two-way ANOVA test.

(D) Western blot analysis of pro-IL-1 $\beta$  and pro-caspase-1 (lysates) or IL-1 $\beta$  and caspase-1 (supernatants) in WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> BMDCs stimulated with LPS as in (B and C) and then treated for 90 min with 2.5  $\mu$ M Nig or 0.5 mM ATP. One experiment representative of three is shown.

(E) Caspase-1 activation in WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> BMDCs treated with LPS and then exposed to 0.5 mM ATP or 2.5  $\mu$ M Nig for 45 min. Cells were harvested and stained with FLICA1 reagent. One experiment representative of three is shown. \*p < 0.05; two-way ANOVA test.

(F) IL-1 $\beta$  secretion by WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> BMDCs treated as in (E) compared with those treated with 10  $\mu$ M Z-WEHD-FMK 15 min before ATP. One experiment representative of three is shown. \*\*p < 0.01, \*\*\*\*p < 0.0001; two-way ANOVA test.

(G and H) Determination of IL-1 $\beta$  (G) and IL-18 (H) by ELISA in culture supernatants from WT, *Tmem176b*<sup>-/-</sup>, and *Tmem176b*<sup>-/-</sup>*Casp1*<sup>-/-</sup> BMDCs treated as in (E). One experiment representative of two is shown. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*\*p < 0.0001; two-way ANOVA test.

(I) Determination of IL-1 $\beta$  in culture supernatants of THP-1-differentiated macrophages expressing GFP or GFP-TMEM176B untreated or treated for 3 h with 0.25  $\mu$ g/mL LPS and then for 2 h with 2.5  $\mu$ M Nig. One experiment representative of four is shown. \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001; two-way ANOVA test.

(J) Calcium determination in WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> BMDCs treated for 3 h with 0.25  $\mu$ g/mL LPS and 0.5 mM ATP. Cells were loaded with Ca<sup>2+</sup>-sensitive probe Fura-2. Emission at 340/380 nm was recorded in time-lapse experiments; 0.5 mM ATP was added when indicated by the arrow. Scale bars, 10  $\mu$ m.

(K) Determination of IL-1 $\beta$  in BMDCs exposed to the NLRP3 inflammasome activator ATP as described in (E) in the presence or absence of the intracellular Ca<sup>2+</sup> chelator BAPTA (100  $\mu$ M) or DMSO vehicle control. One experiment representative of three is shown. \*p < 0.05; two-way ANOVA test.

(L) Determination of IL-1 $\beta$  in BMDCs following inflammasome activation in the presence of control buffer (5 mM) or high K<sup>+</sup> buffer (120 mM). One experiment representative of three is shown. \*p < 0.05; two-way ANOVA test.

(M and N) Determination of IL-1 $\beta$  in BMDCs following inflammasome activation in the presence or absence of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels blockers iberiotoxin (IbTx) in (M) or hydroxychloroquine (HCQ) in (N). One experiment representative of three is shown in each case. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01; two-way ANOVA test.

In ELISA experiments, ND stands for not detected.

Mean  $\pm$  SD are shown.

See also Figure S1.



mature caspase-1 in culture supernatants from *Tmem176b*<sup>-/-</sup> but not WT BMDCs (Figure 1D), higher doses (5  $\mu$ M) of this NLRP3 activator induced cleavage of caspase-1 in WT DCs, whereas lipopolysaccharides (LPS) alone did not (Figure S1D). In agreement with this observation, flow cytometry studies using the FLICA1 reagent revealed higher caspase-1 activation in *Tmem176b*<sup>-/-</sup> BMDCs (Figure 1E), suggesting that caspase-1 may contribute to mature IL-1 $\beta$  secretion by *Tmem176b*<sup>-/-</sup> BMDCs. To confirm these findings, we induced inflammasome activation in WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> BMDCs in the presence or absence of a caspase-1 inhibitor and found that IL-1 $\beta$  secretion was completely inhibited when caspase-1 activation was interrupted (Figure 1F). Moreover, IL-1 $\beta$  secretion was completely abrogated in *Tmem176b*<sup>-/-</sup>*Casp1*<sup>-/-</sup> BMDCs (Figure 1G). Thus, increased IL-1 $\beta$  secretion observed as a result of *Tmem176b* deficiency requires intact caspase-1 activity. Moreover, *Tmem176b*<sup>-/-</sup> BMDCs also secreted higher amounts of IL-18 compared with WT cells in a caspase-1-dependent manner (Figure 1H).

We then speculated that TMEM176B overexpression may impair IL-1 $\beta$  secretion in cells in which the inflammasome was activated. To address this issue, THP-1-differentiated macrophages were transfected with TMEM176B/GFP or GFP alone (Figure S1E) and then treated with LPS and nigericin. TMEM176B overexpression impaired IL-1 $\beta$  secretion compared with GFP-expressing cells (Figure 1I); this effect was not associated with increased cell death (Figure S1F). Thus, cation channel TMEM176B inhibits activation of the NLRP3 inflammasome. On the other hand, TMEM176B expression in BMDCs appears to be modulated, at least in part, by inflammasome activation (Figure S1G), suggesting bidirectional regulation of these pathways. Of note, lower TMEM176B expression was not associated with widespread inhibition of inflammatory mediators (Figure S1G) or with increased cell death (Figure S1H) in inflammasome-stimulated BMDCs.

### TMEM176B Inhibits the Inflammasome through the Control of Cytosolic Ca<sup>2+</sup>

TMEM176B is an endoplasmic reticulum non-selective monovalent cation channel (Segovia et al., 2014). Because the NLRP3 inflammasome is tightly regulated by cytosolic K<sup>+</sup> (Muñoz-Planillo et al., 2013) and Ca<sup>2+</sup> (Murakami et al., 2012) levels, we speculated that TMEM176B may inhibit inflammasome activation through the regulation of ion homeostasis. To address this question, we first determined cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels in WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> BMDCs stimulated with ATP. BMDCs lacking *Tmem176b* showed greater cytosolic Ca<sup>2+</sup> as compared with WT BMDCs (Figure 1J). Interestingly, intracellular Ca<sup>2+</sup> chelation completely blocked IL-1 $\beta$  secretion in WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> BMDCs (Figure 1K). This effect was also dependent on K<sup>+</sup> efflux in WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> BMDCs (Figure 1L).

We recently showed that Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels are involved in ATP-triggered inflammasome activation (Schroeder et al., 2017). We therefore inhibited Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in ATP-treated WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> BMDCs and determined the amounts of IL-1 $\beta$  in culture supernatants. Inhibition of channel function using iberiotoxin or hydroxychloroquine (Schroeder et al., 2017) led to dose-dependent reduction in IL-1 $\beta$  secretion by WT BMDCs. Interestingly, IL-1 $\beta$  secretion

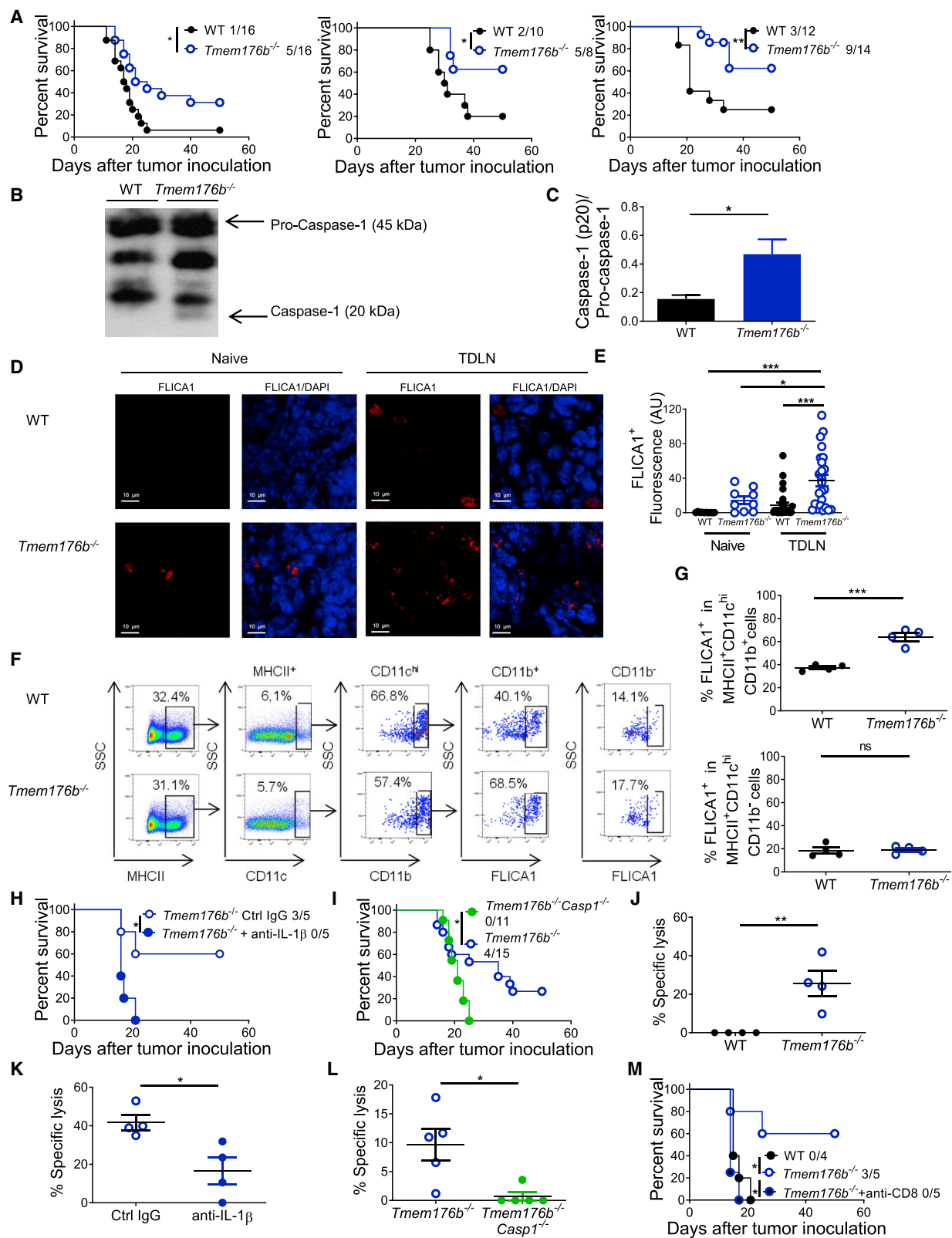
by *Tmem176b*<sup>-/-</sup> BMDCs was completely abrogated by both inhibitors at doses that partially inhibited IL-1 $\beta$  secretion in WT BMDCs (Figures 1M and 1N). Thus, heightened inflammasome activation in *Tmem176b*<sup>-/-</sup> BMDCs is highly dependent on Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. These results suggest that TMEM176B impairs ATP-induced cytosolic Ca<sup>2+</sup> accumulation, preventing Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel-driven inflammasome activation.

### Lack of *Tmem176b* Restrains Tumor Growth in an IL-1 $\beta$ - and Caspase-1-Dependent Manner

To investigate whether TMEM176B-mediated regulation of inflammasome activation may influence antitumor immunity, we first examined the relevance of TMEM176B expression in human cancer. High stromal TMEM176B expression in colon cancer was associated with significantly lower overall patient survival (Figures S2A and S2B). Moreover, we detected a striking negative correlation between *TMEM176B* and *NLRP3/IL1B* expression from single-cell RNA sequencing analysis in macrophages infiltrating human melanoma (data analyzed from Jerby-Aron et al., 2018), suggesting a role for this axis in the tumor microenvironment (Figure S2C). Accordingly, *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice inoculated with MC38 (colon), LL/2 (LLC1; lung), or EG7 (thymic lymphoma) cell lines showed higher survival (Figure 2A) and reduced tumor growth (Figure S2D) compared with WT mice. Although TMEM176B is expressed by the three tumor cell lines studied (Figure S2E), immune cells from tumor-bearing *Tmem176b*<sup>-/-</sup> animals did not show enhanced *in vivo* cytotoxicity against WT cells compared with tumor-bearing *Tmem176b*<sup>+/+</sup> mice (Figure S2F), suggesting that tumor-associated TMEM176B is not immunogenic in *Tmem176b*<sup>-/-</sup> hosts.

To investigate the mechanisms underlying TMEM176B contribution to tumor growth, we studied inflammasome activation and found no differences in caspase-1 activation in tumors developed in WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice (Figure S2G). However, we found increased caspase-1 activation in tumor-draining lymph nodes (TDLN) from *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice compared with WT animals (Figures 2B–2E). Moreover, flow cytometry analysis revealed augmented caspase-1 activation in resident CD11c<sup>hi</sup> MHC II<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> classical DCs (cDCs) in TDLN from *Tmem176b*<sup>-/-</sup> versus WT tumor-bearing mice (Figures 2F, 2G, and S2H). Migratory and resident cDCs were discriminated based on CD11c and MHC II expression (Figure S2H) as described (Laoui et al., 2016). Interestingly, CD11c<sup>hi</sup> MHC II<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> cDCs expressed considerable amounts of TMEM176B (Crozat et al., 2011) and TDLN contained higher frequency of CD11b<sup>+</sup> TMEM176B<sup>+</sup> cells compared with lymph nodes from naive animals (Figure S2I).

Since CD11b<sup>+</sup> cDCs induce differentiation of Th17 cells (Durai and Murphy, 2016), we speculated that this CD4<sup>+</sup> T cell subset may augment in TDLN from *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice. We observed increased frequency of TCR $\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> cells in TDLN from *Tmem176b*<sup>-/-</sup> animals compared with WT and anti-IL-1 $\beta$ -treated *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice (Figure S2J). Moreover, *in vitro* re-stimulation of TDLN cells with ovalbumin (OVA) showed increased proportion of IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in *Tmem176b*<sup>-/-</sup> compared with WT mice (Figure S2K), and *in vivo* IL-17A blockade showed a clear trend toward suppression of the anti-tumor effect in tumor-bearing *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice (Figure S2L). Thus, *Tmem176b* deficiency is associated with an enhanced



(legend on next page)

frequency of functional TCR $\beta^+$  CD4 $^+$  ROR $\gamma$ t $^+$  IL-17 $^+$  T cells in an inflammasome-dependent manner.

To study whether increased inflammasome activation could be responsible for tumor control in mice lacking *Tmem176b*, we blocked IL-1 $\beta$  and studied EG7 tumor development. Treatment with anti-IL-1 $\beta$ -neutralizing antibodies, but not with control immunoglobulin G, eliminated the antitumor activity displayed by *Tmem176b* $^{-/-}$  mice (Figure 2H). This effect was also verified in *Tmem176b* $^{-/-}$  Casp1 $^{-/-}$  DKO mice (Figure 2I). These results suggest that diminished tumor growth observed in *Tmem176b* $^{-/-}$  mice depends on inflammasome activation.

To further examine the cellular effectors involved in tumor growth inhibition in *Tmem176b* $^{-/-}$  mice, we analyzed a panel of immunological mediators by qRT-PCR and found no differences between tumors grown in WT or *Tmem176b* $^{-/-}$  mice (Figure S3A). Moreover, we did not find significant changes in the percentage or absolute number of infiltrating myeloid, B, NK, NKT, or CD4 $^+$  T cells between WT and *Tmem176b* $^{-/-}$  tumors (Figure S3B). However, the percentage of total CD8 $^+$  T cells within tumor infiltrates, as well as the absolute number of total and tumor-specific CD8 $^+$  T cells, was considerably increased in tumors grown in *Tmem176b* $^{-/-}$  mice compared with those developed in WT mice (Figures S4A and S4B). Although the absolute number of CD4 $^+$  CD25 $^+$  Foxp3 $^+$  regulatory T (Treg) cells was higher in tumors developed in *Tmem176b* $^{-/-}$  versus WT animals, an increased effector T cell (CD8)/Treg (Foxp3) ratio was apparent (Figure S4C). Moreover, tumor-infiltrating CD8 $^+$  T cells from *Tmem176b* $^{-/-}$  mice showed greater proliferation compared with those obtained from WT animals when re-stimulated *in vitro* with OVA MHC I peptide (Figure S4D). Interestingly, we found downregulation of the Treg-related molecules Foxp3, CTLA-4, CCL5, CCL19, and CCL22 in TDLN from *Tmem176b* $^{-/-}$  versus WT mice (Figure S3A). Moreover, decreased percentages but not absolute numbers of TCR $\beta^+$  CD4 $^+$  Foxp3 $^+$  Treg cells were observed in TDLN from *Tmem176b* $^{-/-}$  versus WT mice, and

the CD8/Treg ratio in TDLN was significantly increased in *Tmem176b* $^{-/-}$  mice (Figures S5A and B). *In vivo*, MHC I-dependent CD8 $^+$  T cell-mediated cytotoxicity against OVA-expressing cells was increased in tumor-bearing *Tmem176b* $^{-/-}$  compared with WT mice (Figures 2J and S5C). This effect was prevented in *Tmem176b* $^{-/-}$  animals treated with anti-IL-1 $\beta$  antibodies (Figure 2K) as well as in *Tmem176b* $^{-/-}$  Casp1 $^{-/-}$  animals (Figure 2L). Within the tumor microenvironment, CTLs from *Tmem176b* $^{-/-}$  Casp1 $^{-/-}$  animals expressed lower levels of the degranulation marker CD107a than those from *Tmem176b* $^{-/-}$  mice (Figure S5D). Interestingly, depletion of CTLs in *Tmem176b* $^{-/-}$  mice using an anti-CD8 antibody increased tumor growth to similar levels as those observed in WT mice (Figure 2M). Thus, *Tmem176b* deletion enhances CTL-mediated tumor control through mechanisms involving the caspase-1/IL-1 $\beta$  pathway. This mechanism is associated with inflammasome-dependent induction of TCR $\beta^+$  CD4 $^+$  ROR $\gamma$ t $^+$  cells. Altogether, these results support a role for TMEM176B as an emerging immune checkpoint that interrupts inflammasome activation and links innate and adaptive antitumor responses.

### Inflammasome Activation Reinforces Immune Checkpoint Blockade Therapies

Given the influence of *Tmem176b* deletion in antitumor immunity, we investigated whether targeting this ion channel might control the efficacy of immune checkpoint blockade. We found increased survival of *Tmem176b* $^{-/-}$  compared with WT tumor-bearing mice following treatment with anti-CTLA-4 monoclonal antibody (mAb) (Figure 3A). This effect was dependent on inflammasome activation, as it was abrogated in *Tmem176b* $^{-/-}$  Casp1 $^{-/-}$  animals (Figure 3A). To investigate this further, we injected anti-CTLA-4 or anti-PD-1 mAb in EG7 tumor-bearing Casp1/11 $^{-/-}$  or *Nlrp3* $^{-/-}$  mice. Lack of *Casp1/11* eliminated the antitumor effects triggered by CTLA-4 or PD-1 blockade (Figure 3B). Although the experiments performed in *Nlrp3* $^{-/-}$  mice

#### Figure 2. Mice Lacking *Tmem176b* Control Tumor Growth through an IL-1 $\beta$ - and caspase-1-Dependent Manner

(A) Survival of WT and *Tmem176b* $^{-/-}$  mice injected subcutaneously with MC38 colon cancer cells ( $1 \times 10^6$ ; left graph), LL2 lung cancer cells ( $1 \times 10^5$ ; central graph), or EG7 thymic lymphoma cells ( $1 \times 10^6$ ; right graph). Mice survival was monitored every 3 days. The ratio shows the number of surviving animals/total injected mice from three experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; log rank (Mantel-Cox) test.

(B and C) Western blot analysis (B) and semiquantification (C) of pro-caspase-1 and caspase-1 expression in tumor-draining lymph nodes (TDLN) from WT and *Tmem176b* $^{-/-}$  mice. At least four animals/group are shown. \* $p < 0.05$ ; Student's t test.

(D and E) Confocal microscopy (D) and semiquantification (E) of activated caspase-1 expression using the FLICA1 fluorescent probe in TDLN. Scale bars, 10  $\mu$ m.  $n = 3$  each group. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; one-way ANOVA test.

(F) Flow cytometry analysis of FLICA1 $^+$  cells within TDLN. SSC, Side scatter. One experiment representative of two is shown.

(G) Evaluation of FLICA1 $^+$  CD11b $^+$  and CD11b $^-$  classical DCs (cDCs) in TDLN is shown. ns, not significant; \*\*\* $p < 0.001$ ; Student's t test.

(H) Survival of *Tmem176b* $^{-/-}$  EG7 tumor-bearing mice treated with anti-IL-1 $\beta$  or control immunoglobulin G (IgG) antibodies. The ratio shows the number of surviving animals/total injected mice from one experiment. \* $p < 0.05$ ; log rank (Mantel-Cox) test.

(I) Survival of untreated *Tmem176b* $^{-/-}$  and *Tmem176b* $^{-/-}$  Casp1 $^{-/-}$  EG7 tumor-bearing mice. The ratio shows the number of surviving animals/total injected mice pooled from three independent experiments. \* $p < 0.05$ ; log rank (Mantel-Cox) test.

(J) *In vivo* cytotoxicity against OVA-expressing cells in WT and *Tmem176b* $^{-/-}$  EG7 tumor-bearing mice. Data from four different animals and one experiment in each group are shown. \*\* $p < 0.01$ ; Student's t test.

(K) *In vivo* cytotoxicity against OVA-expressing cells in EG7 tumor-bearing *Tmem176b* $^{-/-}$  mice treated with anti-IL-1 $\beta$  neutralizing or control IgG antibodies. \* $p < 0.05$ ; Student's t test.

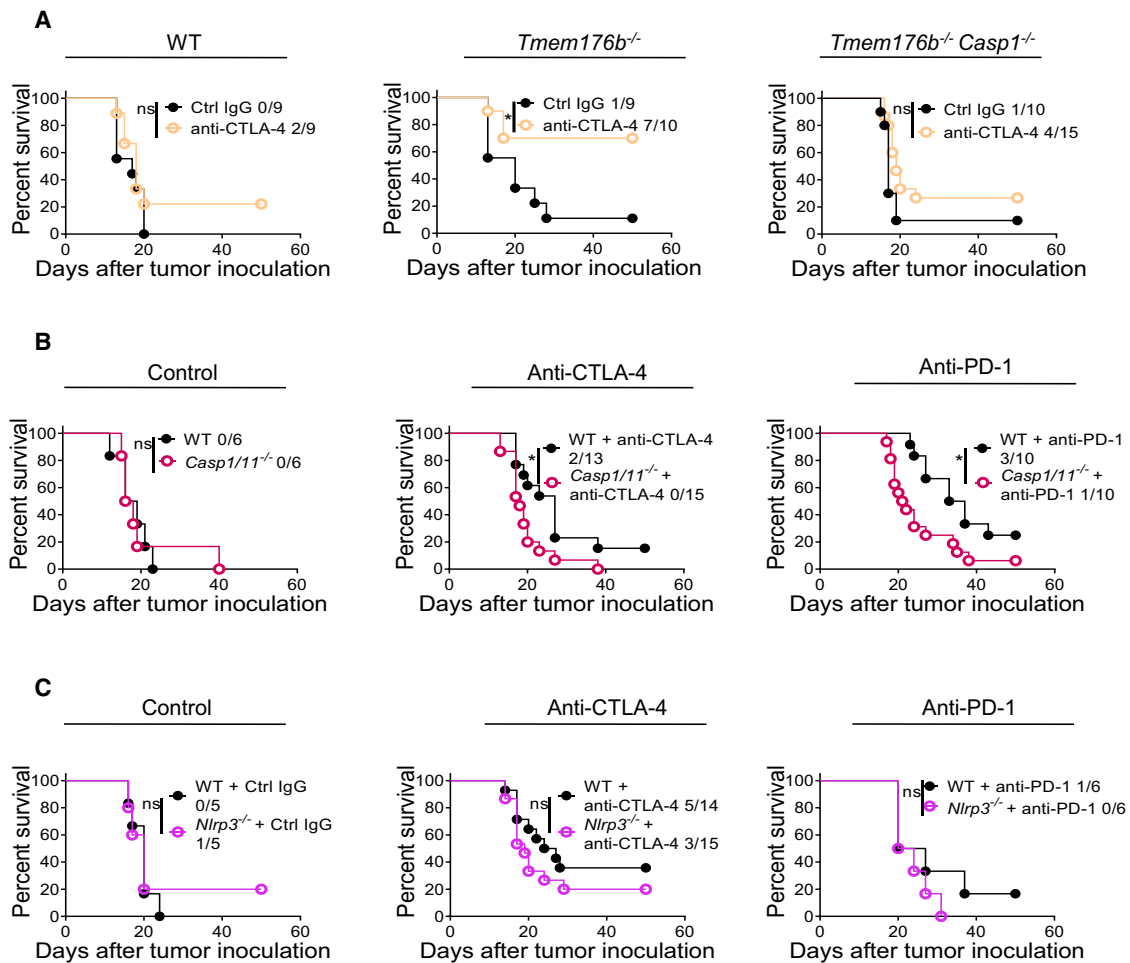
(L) *In vivo* cytotoxicity against OVA-expressing cells in tumor-bearing *Tmem176b* $^{-/-}$  versus *Tmem176b* $^{-/-}$  Casp1 $^{-/-}$  mice. Data from two experiments are shown. \* $p < 0.05$ ; Student's t test.

(M) Survival of tumor-bearing WT and *Tmem176b* $^{-/-}$  mice left untreated or treated with anti-CD8 depleting antibodies. The ratio depicts the number of surviving animals/total injected mice. Data from one experiment are shown. \* $p < 0.05$ ; log rank (Mantel-Cox) test.

The genetic background of the animals used was C57BL/6.

Mean  $\pm$  SD are shown.

See also Figures S2–S5.



### Figure 3. Inflammasome Activation Reinforces Immune Checkpoint Blockade

(A) Survival of WT, *Tmem176b*<sup>-/-</sup>, and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> *Casp1*<sup>-/-</sup> mice inoculated with EG7 tumor cells and receiving anti-CTLA-4 or control IgG antibodies. \**p* < 0.05; log rank (Mantel-Cox) test.

(B and C) Survival of WT and *Casp1/11*<sup>-/-</sup> (B) or *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (C) mice inoculated with EG7 tumor cells and injected with control IgG, anti-CTLA-4, or anti-PD-1 antibodies. ns, not significant; \**p* < 0.05; log rank (Mantel-Cox) test.

Data from three (A and B) or two (C) experiments are shown. The ratio depicts the number of surviving animals/total injected mice.

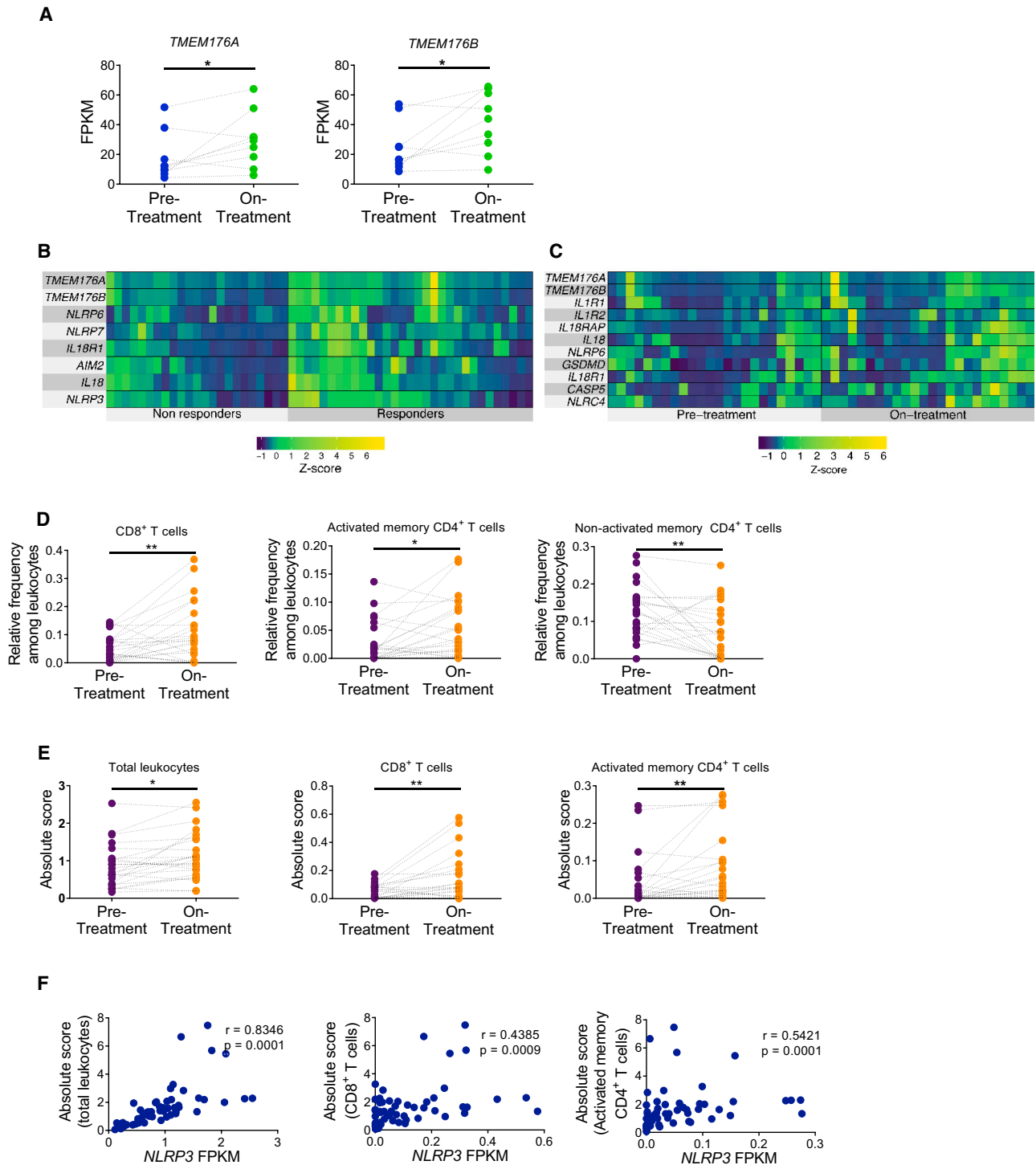
did not reach statistical significance, there was a trend toward lower survival in those mice when treated with anti-CTLA-4 or anti-PD-1 mAb (Figure 3C). Moreover, we found no differences in tumor growth in mice lacking inflammasome components under control conditions (Figures 3B and 3C), in agreement with previous reports (Ghiringhelli et al., 2009). These results highlight the importance of triggering inflammasome activation to improve the efficacy of checkpoint blockade therapies.

### Sensitivity to Immune Checkpoint Blockers Is Associated with an “Inflammasome-Activated” Signature in Cancer Patients

We then investigated whether inflammasome-related genes might be associated with clinical responses in patients treated with immune checkpoint blockers. First, we analyzed whole-exome sequencing and transcriptomics data from a cohort of melanoma patients treated with immune checkpoint inhibitors (Riaz et al., 2017). These studies focused on pre-treatment and

on-treatment tumor biopsies from patients receiving anti-PD-1 mAb after progression from anti-CTLA-4 therapy (IPI-progressing) and patients treated with anti-PD-1 without previous anti-CTLA-4 treatment (IPI-naive). In non-responding patients of the IPI-naive population, only two inflammasome-related genes—*TMEM176A* and *TMEM176B*—were significantly upregulated during treatment compared with pre-treatment (Figure 4A; Table S1). These observations emphasize the role of TMEM176 ionic channels as potential mediators of resistance to checkpoint blockade therapies.

Interestingly, when comparing patients responding or not to anti-PD-1 at the pre-treatment stage, we found no significant differences in inflammasome-related genes in the entire population (Table S2), or in the IPI-naive (Table S3) or IPI-progressed (Table S4) groups. However, eight inflammasome-related genes were significantly upregulated in responders versus non-responders in the entire population during anti-PD-1 treatment (Figure 4B). *TMEM176A* and *TMEM176B* were two of the



**Figure 4. Analysis of the Inflammasome Signature in Tumor Biopsies from Melanoma Patients Treated with Immune Checkpoint Blockers**  
 (A) Paired analysis comparing pre-treatment versus on-treatment melanoma biopsies of patients who did not respond to anti-PD-1 therapy and were not treated previously with anti-CTLA-4 antibody (IPI-naive). \* $p < 0.05$ ; paired Student's t test.  
 (B) Heatmaps of transcriptome analysis from tumor biopsies of melanoma patients responding (responders) or not (non-responders) to anti-PD-1 therapy. \* $p < 0.05$ ; unpaired Student's t test.  
 (C) Paired analysis comparing pre-treatment versus on-treatment melanoma biopsies of patients responding to anti-PD-1 therapy. The indicated inflammasome-related genes were significantly upregulated during therapy.  $p < 0.05$ ; paired Student's t test.

(legend continued on next page)

inflammasome-related genes that were significantly upregulated in patients responding to anti-PD-1, suggesting that they could function as a counter-regulatory mechanism in response to treatment. Similar findings were observed in the IPI-naïve population (Table S5). We then performed a paired analysis of tumor biopsies comparing pre-treatment and on anti-PD-1 treatment from responding patients. We found 11 inflammasome-related genes that were significantly upregulated during anti-PD-1 therapy compared with pre-treatment biopsies (Figure 4C). Similar results were found when analyzing the IPI-naïve population (Table S6).

We then estimated the diversity of leukocyte populations infiltrating tumors using the CIBERSORT method (Newman et al., 2015). We observed increased relative frequencies of CD8<sup>+</sup> T cells and activated memory CD4<sup>+</sup> T cells during anti-PD-1 treatment versus pre-treatment in responders but not in progressors (Figure 4D). Absolute number of leukocytes, CD8<sup>+</sup> T cells, and activated memory CD4<sup>+</sup> T cells were also increased (Figure 4E). In patients responding to anti-PD-1 therapy, the total number of leukocytes, as well as the frequency of CD8<sup>+</sup> T cells and activated memory CD4<sup>+</sup> T cells, were positively associated with expression of *NLRP3* during ongoing treatment (Figure 4F). These observations reinforce the concept that inflammasome activation controls T cell immunity in patients treated with immune checkpoint blockers.

To validate further these observations, we analyzed the inflammasome gene expression profile in longitudinal tumor biopsies from melanoma patients treated sequentially with anti-CTLA-4 and anti-PD-1 mAb (Chen et al., 2016). These authors studied gene expression profiling (GEP) via a custom 795-gene panel composed of immune and cancer-related genes which did not include *TMEM176A* and *TMEM176B*. The authors found no significant differences in GEP when comparing responders versus progressors before anti-CTLA-4 or anti-PD-1 therapy. Consistently, we found no significant expression of inflammasome-related genes at these stages (Figures S6A, S6B, S7A, and S7B). These results are in agreement with our findings from the analysis of the Riaz et al. cohort at the pre-treatment stage (Tables S1–S4). However, the authors found 411 genes that were significantly regulated (mostly upregulated) in responders versus progressors following PD-1 blockade. In those patients, 15/16 inflammasome-related genes were significantly upregulated in responders compared with progressors (Figure 5A). We then performed a paired analysis of the 16 inflammasome-related genes in biopsies of 5 responders and 7 progressors comparing gene expression profiles before and during anti-PD-1 therapy. All these patients had progressed to anti-CTLA-4 therapy. Critically, 5/5 patients responding to anti-PD-1 mAb showed a significant upregulation of inflammasome-related genes during anti-PD-1 treatment (Figure 5B). Moreover, 4/7 patients who did not respond to anti-PD-1 therapy significantly downregulated the inflammasome signature during PD-1 blockade (Figure 5B).

Thus, gene expression profiles from biopsies of two independent cohorts of melanoma patients treated with immune checkpoint blockers revealed strong association between inflammasome activation and clinical responses. These findings support the notion that inflammasome activation contributes to antitumor responses triggered by immune checkpoint blockers and highlights the value of an “inflammasome activation” signature as a potential biomarker of response to immune checkpoint blockade.

### Pharmacologic Inhibition of TMEM176B Triggers Inflammasome-Dependent Tumor Control and Improves the Efficacy of Immune Checkpoint Blockers

To identify compounds capable of improving the efficacy of immune checkpoint blockers by inhibiting TMEM176B-dependent ion flux and triggering inflammasome activation, we set up an *in vitro* assay. In brief, CHO-7 cells were transfected with TMEM176B- and TMEM176A-mCherry. Cells were then loaded with the Na<sup>+</sup>-sensitive fluorescent dye Asante NaTRIUM Green 2 (ANG-2). We observed increased ANG-2 mean fluorescence intensity in mCherry<sup>+</sup> compared with mCherry<sup>-</sup> cells (Figure 6A). We then screened a library of compounds known to modulate ion channel activity (Data S1). We found that both enantiomers of BayK8644 potently inhibited TMEM176B-A-dependent Na<sup>+</sup> influx, while they minimally affected TMEM176B-A-negative cells (Figures 6A, 6B, and S8A), thus prompting the study of these compounds. Whereas (+) BayK8644 is known to inhibit L-type voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels, the (–) stereoisomer activates those channels (Hamilton et al., 1987). Since both isomers inhibit TMEM176B/A activity, it is unlikely that our observations could be explained by their effects on Na<sup>+</sup> influx through the modulation of Ca<sup>2+</sup> channels. In electrophysiology studies using TMEM176B-overexpressing *Xenopus* oocytes, (+) BayK8644 completely inhibited TMEM176B-dependent current (Figure 6B). Therefore, we focused on the (+) isomer for functional experiments.

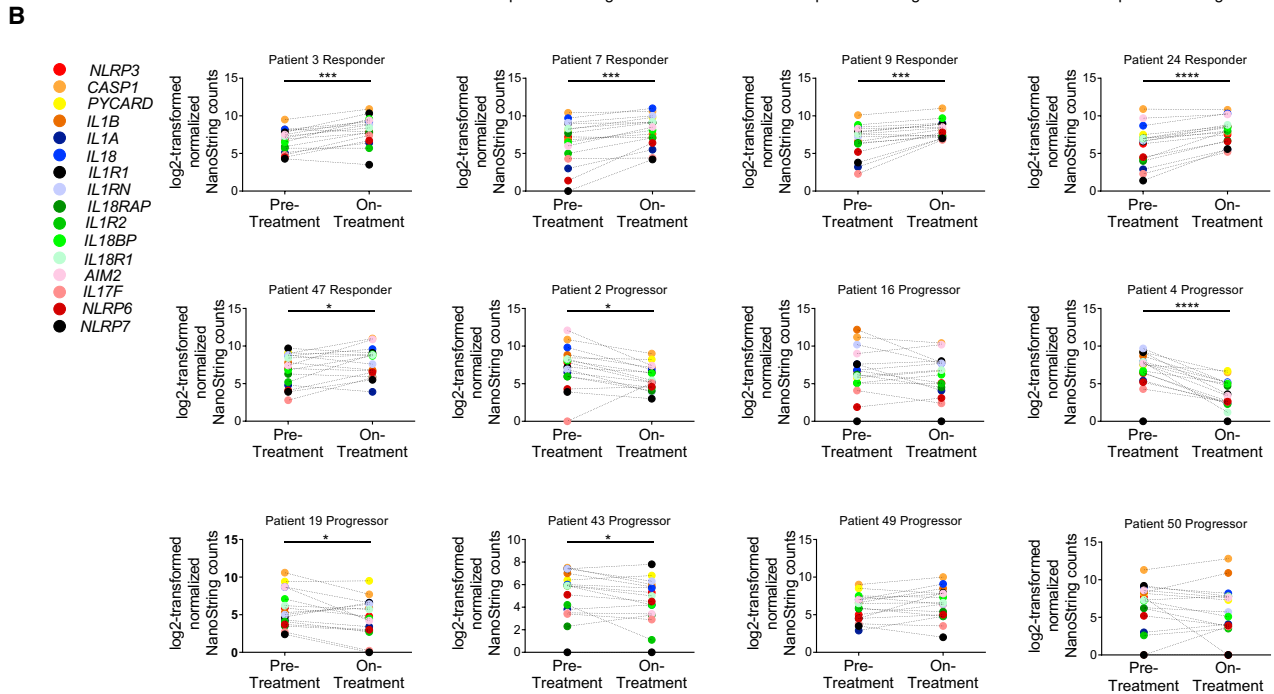
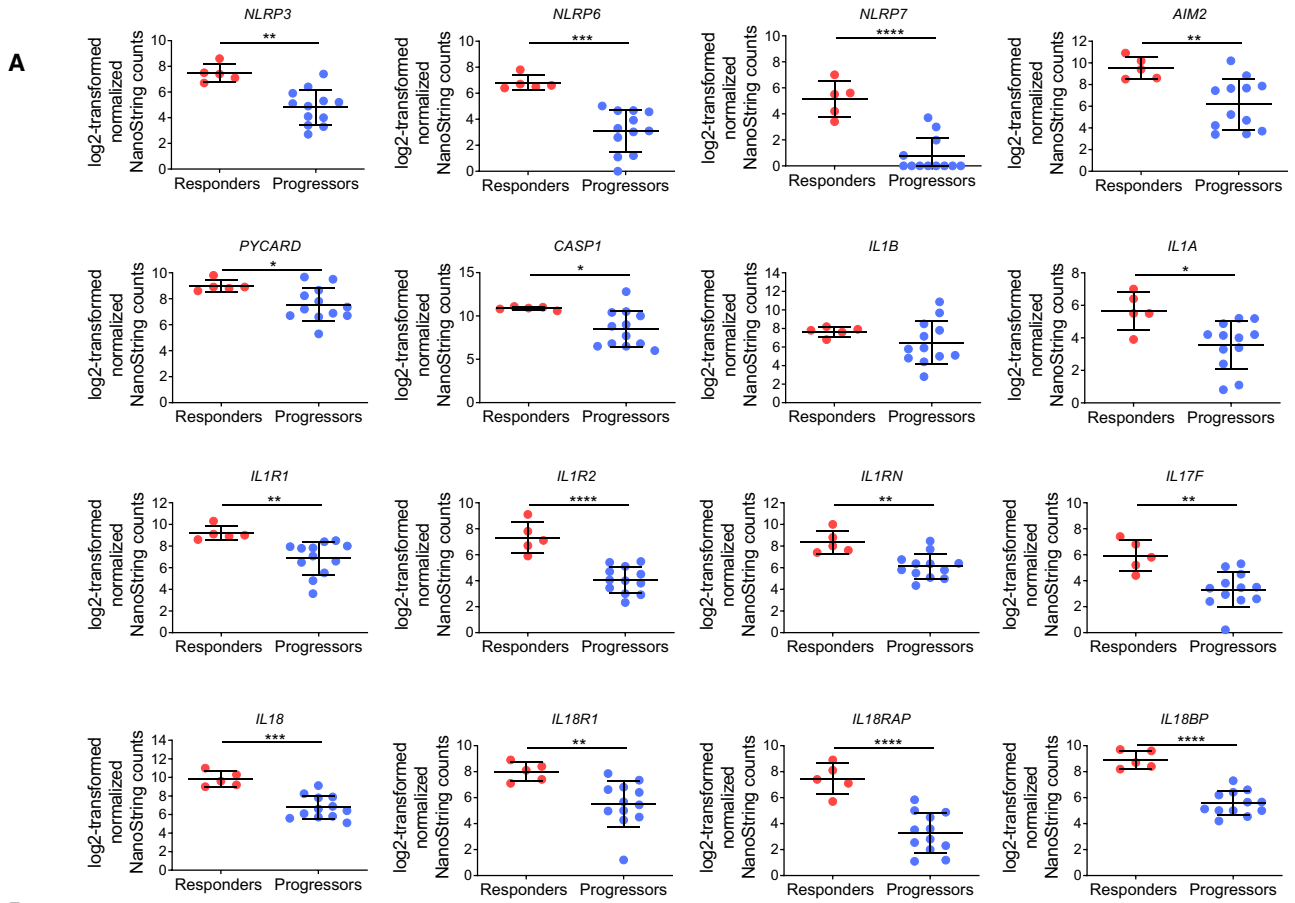
We found that BayK8644 induced IL-1 $\beta$  secretion and caspase-1 activation in LPS-primed WT but not in *Tmem176b*<sup>-/-</sup> BMDCs (Figures 6C and S8B–S8D). Interestingly, BayK8644-induced IL-1 $\beta$  secretion was inhibited by the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel (KCa) inhibitors tetraethylammonium and hydroxychloroquine (Figure 6D). Thus, BayK8644 treatment on WT BMDCs phenocopied *Tmem176b* deficiency. In THP-1-differentiated macrophages, TMEM176B-dependent inhibition of IL-1 $\beta$  secretion was prevented when these cells were treated with BayK8644 (Figure 6E). These results suggest that BayK8644 triggers inflammasome activation through inhibition of TMEM176B.

We then explored whether BayK8644 treatment may control tumor growth *in vivo*. Administration of BayK8644 significantly increased survival of tumor-bearing WT but not *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice (Figure 6F) compared with injection of vehicle control. Of note, *in vitro* treatment of EG7 thymic lymphoma cells with

(D and E) Paired study of the relative frequency (D) and absolute number (E) of the indicated cell populations between pre-treatment versus on-treatment tumor biopsies from total patients responding to anti-PD-1 therapy analyzed by the CIBERSORT method. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01; paired Student's t test.

(F) Association of *NLRP3* expression with the frequency of total leukocytes, CD8<sup>+</sup> T cells and activated memory CD4<sup>+</sup> T cells in patients responding to anti-PD-1 therapy. Results show transcriptomics data obtained from tumor biopsies at the on-treatment stage.

See also Tables S1–S6.



(legend on next page)

BayK8644 did not induce apoptosis at similar doses as those detected in plasma after intraperitoneal injection (Figure S8E). To explore whether BayK8644 recapitulated the effects in tumor growth control observed in untreated *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice, we evaluated its influence on inflammasome activation by disrupting important components of this pathway. We found that BayK8644 significantly improved survival of WT but not *Casp1/11*<sup>-/-</sup> tumor-bearing mice (Figure 6G). Consistent with this observation, BayK8644 increased the frequency of CD11b<sup>+</sup> cDCs expressing active caspase-1 in TDLN (Figure 6H). Moreover, BayK8644-induced tumor control was mediated by CD8<sup>+</sup> T cells as it increased CD8<sup>+</sup> T cell-dependent tumor cytotoxicity *in vivo* (Figure 6I), and depletion of CD8<sup>+</sup> T cells completely abolished the antitumor effect of this inhibitor (Figures 6J and S8F). Thus, BayK8644 restrains EG7 tumor growth in a TMEM176B-, caspase-1/11-, and CD8<sup>+</sup> T cell-dependent manner, phenocopying *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice. Moreover, BayK8644 significantly impaired growth of CT26 colon cancer cells in BALB/c mice (Figures S8G and S8H). Thus, BayK8644 emerges as an immunotherapeutic agent that limits tumor growth by licensing inflammasome activation.

Finally, we evaluated whether BayK8644 administration may enhance the antitumor activity of immune checkpoint blockers. Compared with mice receiving monotherapy, administration of BayK8644 in combination with anti-CTLA-4 mAb significantly improved survival of EG7 tumor-bearing mice (Figure 6K). Moreover, therapeutic administration of BayK8644 in mice with established tumors significantly improved the antitumoral effect of anti-PD-1 treatment (Figure 6L), whereas BayK8644 monotherapy was not effective in this therapeutic protocol (data not shown). Interestingly, combination of anti-PD-1 with BayK8644 was associated with an increased absolute number and percentage of TCRβ<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> RORγt<sup>+</sup> T cells in TDLN (Figure S8I) and increased frequency of tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells within the tumor microenvironment (Figure 6M) compared with anti-PD-1 monotherapy. Depletion of CD8<sup>+</sup> T cells in mice treated with anti-PD-1 plus BayK8644 abrogated antitumor immunity (Figure 6N). This observation might be explained by concomitant CTLA-mediated mechanisms required for both the antitumor activity of BayK8644 (Figures 6J and S8F) and anti-PD-1 mAb (Sharma and Allison, 2015). Thus, as expected, combination treatment strongly relies on the CD8<sup>+</sup> T cell compartment. Furthermore, BayK8644 significantly enhanced the antitumoral effect of anti-PD-1 therapy in mice bearing 5555 melanoma (Figure 6O), whereas this effect was apparent in LL/2 lung cancer (Figures S8J and S8K) and MC38 colon cancer (Figures S8L and S8M) models, albeit not reaching statistical significance. Moreover, whereas BayK8644 reinforced the antitumor effects of anti-PD-1 treatment in mouse melanoma, it did not enhance tumor growth inhibition induced by anti-CTLA-4 and anti-PD-1

combination therapy, at least in this model (Figure S8O). Given the pharmacologic impact of channel inhibitors in cardiomyocyte function, we finally examined whether BayK8644 may lead to acute cardiac toxicity. Notably, BayK8644 treatment was not associated with electrocardiographic nor echocardiographic alterations 30 min after intravenous injection compared with mice treated with vehicle control (Tables 1 and 2). Thus, pharmacological inhibition of TMEM176B represents a potential therapeutic approach to unleash inflammasome activation, leading to potentiation of CD8<sup>+</sup> T cell-dependent antitumor immunity.

## DISCUSSION

In this study, we demonstrate a central role of the inflammasome in reinforcing CD8<sup>+</sup> T cell-dependent antitumor immunity and enhancing the efficacy of checkpoint blockade therapies. In particular, we demonstrate a key role of TMEM176B as negative regulator of inflammasome activation. Whereas most immunotherapeutic modalities have focused on drugs targeting adaptive components of the immune system, innate immune pathways may represent additional anticancer targets (Woo et al., 2014).

Although recently proposed to play a role in immunotherapy (Mangan et al., 2018), the direct contribution of IL-1β/IL-18 inflammasomes to antitumor immunity and adaptive checkpoint blockade remains elusive (Karki et al., 2017). Here we identify a therapeutic strategy that reinforces antitumor responses by targeting TMEM176B and promoting inflammasome disinhibition. Our results suggest that inflammasome activation plays a central role in antitumor immunity triggered by anti-CTLA-4 and anti-PD-1 mAb. Although experiments in *Nlrp3*<sup>-/-</sup> animals did not reach statistical significance, studies in animals lacking the downstream effectors *Casp1/11* did. These observations suggest that different inflammasomes could mediate the antitumoral effect triggered by anti-CTLA-4 and anti-PD-1 therapies. Accordingly, analysis of anti-PD-1-treated melanoma patients suggested that NLRP6, NLRP7, AIM2, and NLRC4 inflammasomes might contribute to antitumor responses unleashed by checkpoint blockers. Although the requirement of caspase-1 autoproteolysis can differ among different inflammasomes (Broz et al., 2010), and caspase-1 may cleave other proteins than IL-1β and IL-18 (Sokolovska et al., 2013), to our knowledge, caspase-1/11 activation mostly depends on inflammasomes. Thus, it is unlikely that observations in *Casp1/11*<sup>-/-</sup> and *Tmem176b*<sup>-/-</sup>*Casp1*<sup>-/-</sup> mice could involve inflammasome-independent mechanisms.

Our results suggest that TMEM176B might be a predictive marker of response to anti-PD-1 therapy. In addition, TMEM176B expression in the tumor stroma was associated with poor survival

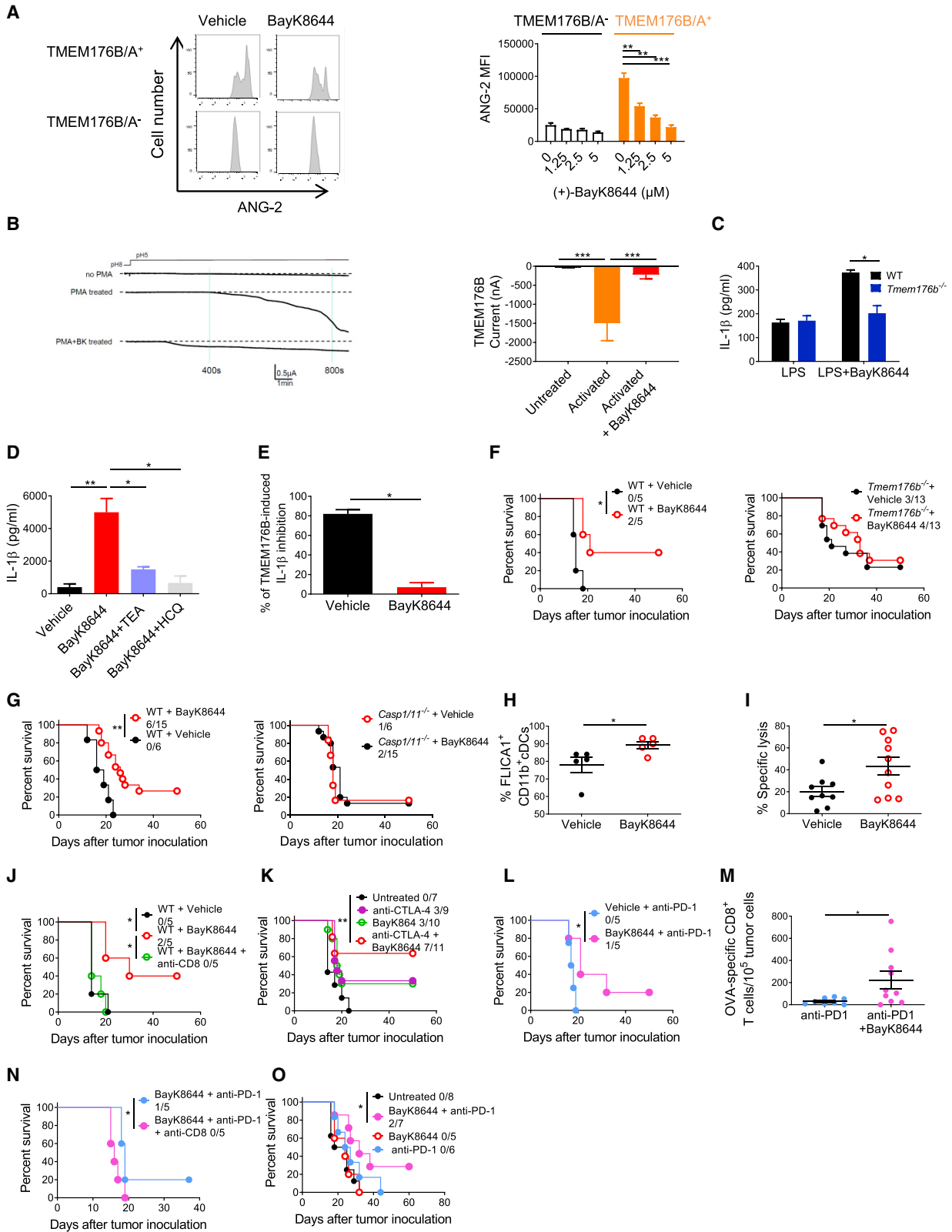
### Figure 5. Analysis of the Inflammasome Signature in Tumor Biopsies from Melanoma Patients Treated with Immune Checkpoint Blockers

(A) Log<sub>2</sub>-transformed normalized NanoString counts for the indicated inflammasome-related genes in melanoma tumor biopsies from patients being treated with anti-PD-1 mAb. The results for responding and non-responding patients as defined by Chen et al. (2016). Mean ± SD are shown. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001; unpaired Student's t test.

(B) Paired analysis of the 16 inflammasome-related genes studied in (A) comparing pre-treatment and on-treatment tumor biopsies from melanoma patients responding (n = 5) or not responding (n = 7) to anti-PD-1 therapy. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001; paired Student's t test.

See also Figures S6 and S7.





(legend on next page)

**Table 1. Effect of BayK8644 on Electrocardiographic Parameters**

|                      | RR                    | P wave     | PR         | QRS        | QT         | QTc        |
|----------------------|-----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Control <sup>a</sup> | 150 ± 18 <sup>b</sup> | 16.0 ± 0.0 | 32.0 ± 2.0 | 13.3 ± 1.2 | 53.3 ± 4.1 | 43.6 ± 0.8 |
| Vehicle              | 143 ± 9               | 14.7 ± 0.7 | 32.0 ± 1.5 | 13.7 ± 1.8 | 56.0 ± 2.5 | 46.8 ± 0.8 |
| Control              | 130 ± 2               | 15.2 ± 1.2 | 32.8 ± 1.9 | 11.0 ± 0.4 | 51.2 ± 2.7 | 45.1 ± 2.7 |
| BayK8644             | 120 ± 5               | 15.4 ± 1.2 | 32.6 ± 1.8 | 11.2 ± 0.6 | 54.4 ± 1.9 | 49.7 ± 0.8 |

<sup>a</sup>Values before injection of vehicle control or BayK8644.

<sup>b</sup>Mean ± SD are expressed in ms.

in colorectal cancer patients, suggesting a potential role of this ion channel as a prognostic factor. Interestingly, TMEM176B was associated with diminished *NLRP3* and *IL1B* expression in macrophages infiltrating human melanoma, suggesting that this ion channel may function as an innate checkpoint signal that hinders immune responses in the tumor microenvironment. However, our results in experimental models support a key role for TMEM176B in the modulation of inflammasome activation mostly in TDLN during the induction phase of antitumor responses. Thus, TMEM176B-dependent immune inhibitory mechanisms may operate within the tumor microenvironment and TDLN.

Sustained K<sup>+</sup> efflux through the voltage-gated (K<sub>v</sub>1.3) or Ca<sup>2+</sup>-activated (KCa3.1) K<sup>+</sup> channels has been shown to reinvigorate tumor-infiltrating T cells (Eil et al., 2016). The results presented here suggest that Ca<sup>2+</sup>-induced K<sup>+</sup> efflux in DCs may promote antitumor immunity by triggering inflammasome activation, a process that is repressed by TMEM176B.

In conclusion, our study links inflammasome activation to anti-tumor responses triggered by immune checkpoint blockers, highlighting a central role for TMEM176B, an ion channel expressed on myeloid cells, in repression of T cell-dependent immunity. Further efforts should be aimed at evaluating the clinical

#### Figure 6. Targeting TMEM176B with BayK8644 Triggers Inflammasome-Dependent Antitumor Immunity

(A) TMEM176B activity in CHO-7 cells treated or not with BayK8644. Representative flow cytometry histograms displaying ANG-2 fluorescence at the indicated conditions (left) and quantification of ANG-2 mean fluorescence intensity (MFI) (right). One experiment representative of five is shown. \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001; two-way ANOVA test.

(B) TMEM176B-dependent conductance assessed in *Xenopus* oocytes following addition of 10 μM (+) BayK8644 to extracellular buffer during phorbol myristate acetate (PMA) stimulation. Representative currents (left) and determination of TMEM176B current at 800 s post-extracellular acidification (right) are shown. \*\*\*p < 0.001; one-way ANOVA test.

(C) Determination of IL-1β in culture supernatants from WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> BMDCs primed for 3 h with LPS and then treated or not with 2.5 μM BayK8644. One experiment representative of three is shown. \*p < 0.05; two-way ANOVA test.

(D) Determination of IL-1β in culture supernatants from WT BMDCs primed with LPS and then treated with 10 μM BayK8644 alone or in combination with tetraethylammonium (TEA) (2 mM) or HCQ (10 μM). One experiment representative of three is shown. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01; one-way ANOVA test.

(E) Determination of IL-1β in culture supernatants from THP-1-differentiated macrophages transfected with GFP or TMEM176B/GFP-coding plasmids and then treated or not with LPS plus nigericin (LPS/Nig) in the presence of ethanol (vehicle) or 5 μM BayK8644. To calculate the extent of TMEM176B-dependent inhibition, IL-1β levels (pg/mL) were incorporated to the formula: [GFP/LPS/Nig – GFP untreated] – TMEM176B/LPS/Nig × 100. One experiment representative of three is shown. \*p < 0.05; Student's t test.

(F and G) Survival of WT (F and G) and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> (F) or *Casp1/11*<sup>-/-</sup> (G) mice inoculated with EG7 tumor cells and treated with 1 mg/kg BayK8644 i.p. on days 2–15 after tumor cell injection. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01; log rank (Mantel-Cox) test.

(H) Caspase-1 activation in TDLN from WT mice inoculated with EG7 tumor cells and then treated or not with 1 mg/kg BayK8644 on days 2–13. TDLN were resected 14 days after tumor injection and caspase-1 activation was studied by flow cytometry using the FLICA1 reagent. \*p < 0.05; Student's t test.

(I) *In vivo* cytotoxicity against OVA-expressing cells in WT mice inoculated with EG7 tumor cells treated or not with BayK8644 as in (F). At day 15, *in vivo* cytotoxicity was determined. \*p < 0.05; Student's t test.

(J) Survival of tumor (EG7)-bearing WT mice treated with BayK8644 or vehicle control, receiving or not anti-CD8 depleting antibody. ns, not significant. WT + Vehicle versus WT + BayK8644: \*p < 0.05; WT + BayK8644 versus WT + BayK8644 + anti-CD8: \*p < 0.05; WT + Vehicle versus WT + BayK8644 + anti-CD8: ns; log rank (Mantel-Cox) test.

(K) Survival of tumor (EG7)-bearing WT mice treated or not with BayK8644, anti-CTLA-4 mAb, or BayK8644 plus anti-CTLA-4 mAb. ns, not significant. Untreated versus BayK8644 + anti-CTLA-4: \*\*p < 0.01; BayK8644 versus BayK8644 + anti-CTLA-4: ns; anti-CTLA-4 versus BayK8644 + anti-CTLA-4: ns; untreated versus anti-CTLA-4: ns; untreated versus BayK8644: ns; log rank (Mantel-Cox) test.

(L) Survival of tumor (EG7)-bearing WT mice treated or not with 250 μg anti-PD-1 mAb at days 6, 9, and 12 after tumor inoculation. BayK8644 was injected every day since day 9 (when all mice had established tumors) until day 21. \*p < 0.05; log rank (Mantel-Cox) test.

(M) Frequency of OVA-specific CD8<sup>+</sup> T cells as determined by flow cytometry using fluorescent MHC pentamers in EG7 tumor suspensions from WT mice treated with anti-PD-1 alone or anti-PD-1 + BayK8644 in a therapeutic protocol as in (L). \*p < 0.05; unpaired Student's t test.

(N) Survival of tumor (EG7)-bearing WT mice treated or not with BayK8644 plus anti-PD-1 mAb in the absence or presence of anti-CD8 depleting mAb. \*p < 0.05; log rank (Mantel-Cox) test.

(O) Survival of WT mice inoculated with 5,555 melanoma cells and left untreated or treated either with anti-PD-1 mAb (days 6, 9, and 12), BayK8644 (days 9–21), or both. All animals had established tumors when BayK8644 treatment was started. ns, not significant. Untreated versus BayK8644 + anti-PD-1: \*p < 0.05; BayK8644 versus BayK8644 + anti-PD-1: ns; anti-PD-1 versus BayK8644 + anti-PD-1: ns; untreated versus anti-PD-1: ns; untreated versus BayK8644: ns; log rank (Mantel-Cox) test.

In (F), (G), and (J–O) the ratio represents the number of surviving mice/total injected mice. For these experiments we used C57BL/6 mice.

Mean ± SD are shown.

See also Figure S8.

**Table 2. Effect of BayK8644 on Echocardiographic Parameters**

|  | Vehicle    | BayK8644   |
|--|------------|------------|
| Cardiac frequency (bpm)                              | 457 ± 50   | 515 ± 35   |
| Left ventricular telediastolic wall thicknesses (mm) | 1.0 ± 0.0  | 1.1 ± 0.1  |
| Left ventricular telediastolic diameter (mm)         | 3.2 ± 0.2  | 2.8 ± 0.2  |
| Left ventricular ejection fraction (%)               | 82 ± 1     | 93 ± 2     |
| E/A ratio  | 1.7 ± 0.1  | 1.5 ± 0.1  |
| Isovolumic relaxation time (ms)                      | 15.0 ± 0.0 | 18.8 ± 0.2 |
| E-wave deceleration time (ms)                        | 37.7 ± 1.8 | 33.4 ± 2.5 |

Mean ± SD are expressed.

efficacy and safety of inflammasome disinhibition in the treatment of cancer patients, particularly those resistant to current immunotherapies.

## STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- **KEY RESOURCES TABLE**
- **CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING**
- **EXPERIMENTAL MODELS AND SUBJECT DETAILS**
  - Animals
  - Cell Lines
  - Tumor Models and Treatments
  - *In Vivo* Inflammasome Activation
  - *In Vitro* Inflammasome Activation
  - THP-1 Transfection and Inflammasome Activation
- **METHOD DETAILS**
  - Cytosolic Ca<sup>++</sup> Determination
  - *In Vivo* Cytotoxicity Assay
  - Screening of TMEM176B Inhibitors
  - Immunohistochemistry of Human Colon Microarrays
  - Electrophysiology Experiments
  - Quantitative RT-PCR
  - Gene Expression Analysis
  - CIBERSORT Analysis
  - Single Cell RNA-Seq Data Analysis
  - Statistical Analyses
- **DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY**

## SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.04.003>.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Uruguay INNOVA-2, FMV from ANII, CABBIO, PEDECIBA, ECOS-SUD AUF/FAPESP, and FOCEM (MERCOSUR Structural Convergence Fund) COF 03/11 grants to M.H., CSIC UdelaR and FCE from ANII to M.S., Harry J Lloyd Foundation to M.R.G., the Argentinean Cancer Institute to Y.D.M., Argentinean Agency for Promotion of Science and Technology to G.A.R. and M.R.G., Bunge & Born, Sales and Richard Lounsbery Foundations to G.A.R. and Wellcome Trust to R.A.F. We thank Sabrina Gatto for technical support.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, M.S., S.R., M.C.C., G.A.R., and M.H.; Methodology, M.S. and S.R.; Validation, R.A.F., M.C.C., B.V., M.R.G., G.A.R., and M.H.; Investigation, M.S., S.R., M.J., V.P., M.D., Y.D.M., S.V., F.V., M.R.G., P.C., and M.R.; Writing – Original Draft, M.S., S.R., M.R.G., G.A.R., and M.H.; Funding Acquisition, M.H.; Resources, C.L., R.A.F., I.A., and M.C.C.; Supervision, M.H.

## DECLARATION OF INTERESTS

M.H. is founder and CSO of ARDAN Immuno Pharma. Three patent applications related to this work have been filed at the USA Patent and Trademark Office.

Received: June 21, 2018

Revised: February 20, 2019

Accepted: April 10, 2019

Published: May 13, 2019

## REFERENCES

- Binnewies, M., Roberts, E.W., Kersten, K., Chan, V., Fearon, D.F., Merad, M., Coussens, L.M., Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., Hedrick, C.C., et al. (2018). Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat. Med.* 24, 541–550.
- Broz, P., von Moltke, J., Jones, J.W., Vance, R.E., and Monack, D.M. (2010). Differential requirement for caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host Microbe* 8, 471–483.
- Chen, P.-L., Roh, W., Reuben, A., Cooper, Z.A., Spencer, C.N., Prieto, P.A., Miller, J.P., Bassett, R.L., Gopalakrishnan, V., Wani, K., et al. (2016). Analysis of immune signatures in longitudinal tumor samples yields insight into biomarkers of response and mechanisms of resistance to immune checkpoint blockade. *Cancer Discov.* 6, 827–837.
- Condamine, T., Le Texier, L., Howie, D., Lavault, A., Hill, M., Halary, F., Cobbold, S., Waldmann, H., Cuturi, M.-C., and Chiffolleau, E. (2010). Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 88, 507–515.
- Crozat, K., Tamoutounour, S., Vu Manh, T.-P., Fossum, E., Luche, H., Ardouin, L., Williams, M., Azukizawa, H., Bogen, B., Malissen, B., et al. (2011). Cutting edge: expression of XCR1 defines mouse lymphoid-tissue resident and migratory dendritic cells of the CD8+ type. *J. Immunol.* 187, 4411–4415.
- van Dijk, D., Sharma, R., Nainys, J., Yim, K., Kathail, P., Carr, A.J., Burdziak, C., Moon, K.R., Chaffer, C.L., Pattabiraman, D., et al. (2018). Recovering gene interactions from single-cell data using data diffusion. *Cell* 174, 716–729.e27.
- Durai, V., and Murphy, K.M. (2016). Functions of murine dendritic cells. *Immunity* 45, 719–736.
- Eil, R., Vodnala, S.K., Clever, D., Klebanoff, C.A., Sukumar, M., Pan, J.H., Palmer, D.C., Gros, A., Yamamoto, T.N., Patel, S.J., et al. (2016). Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function. *Nature* 537, 539–543.
- Eon Kuek, L., Leffler, M., Mackay, G.A., and Hulett, M.D. (2016). The MS4A family: counting past 1, 2 and 3. *Immunol. Cell Biol.* 94, 11–23.
- Schroeder, M.E., Russo, S., Costa, C., Hori, J., Tiscornia, I., Bollati-Fogolin, M., Zamboni, D.S., Ferreira, G., Cairoli, E., and Hill, M. (2017). Pro-inflammatory Ca<sup>++</sup>-activated K<sup>+</sup> channels are inhibited by hydroxychloroquine. *Sci. Rep.* 7, 1892.
- Gaidt, M.M., Ebert, T.S., Chauhan, D., Ramshorn, K., Pinci, F., Zuber, S., O’Duill, F., Schmid-Burgk, J.L., Hoss, F., Buhmann, R., et al. (2017). The DNA inflammasome in human myeloid cells is initiated by a STING-Cell death program upstream of NLRP3. *Cell* 171, 1110–1124.e18.
- Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K., Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E., et al. (2009). Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat. Med.* 15, 1170–1178.
- Gong, T., Yang, Y., Jin, T., Jiang, W., and Zhou, R. (2018). Orchestration of NLRP3 inflammasome activation by ion fluxes. *Trends Immunol.* 39, 393–406.

- Hamilton, S.L., Yatani, A., Brush, K., Schwartz, A., and Brown, A.M. (1987). A comparison between the binding and electrophysiological effects of dihydropyridines on cardiac membranes. *Mol. Pharmacol.* *31*, 221–231.
- Hirata, E., Girotti, M.R., Viros, A., Hooper, S., Spencer-Dene, B., Matsuda, M., Larkin, J., Marais, R., and Sahai, E. (2015). Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin  $\beta$ 1/FAK signaling. *Cancer Cell* *27*, 574–588.
- Jerby-Aron, L., Shah, P., Cuoco, M.S., Rodman, C., Su, M.-J., Melms, J.C., Leeson, R., Kanodia, A., Mei, S., Lin, J.-R., et al. (2018). A cancer cell program promotes T cell exclusion and resistance to checkpoint blockade. *Cell* *175*, 984–997.e24.
- Karki, R., Man, S.M., and Kanneganti, T.-D. (2017). Inflammasomes and cancer. *Cancer Immunol. Res.* *5*, 94–99.
- Laoui, D., Keirsse, J., Morias, Y., Van Overmeire, E., Geeraerts, X., Elkrim, Y., Kiss, M., Bolli, E., Lahmar, Q., Sichien, D., et al. (2016). The tumour microenvironment harbours ontogenically distinct dendritic cell populations with opposing effects on tumour immunity. *Nat. Commun.* *7*, 13720.
- Louvet, C., Chiffolleau, E., Heslan, M., Tesson, L., Heslan, J.-M., Brion, R., Bériou, G., Guillonnet, C., Khalife, J., Anegon, I., et al. (2005). Identification of a new member of the CD20/FcepsilonRIbeta family overexpressed in tolerated allografts. *Am. J. Transplant.* *5*, 2143–2153.
- Mangan, M.S.J., Olhava, E.J., Roush, W.R., Seidel, H.M., Glick, G.D., and Latz, E. (2018). Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* *17*, 588–606.
- Muñoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martínez-Colón, G., Smith, B.L., Rajendiran, T.M., and Núñez, G. (2013).  $K^+$  efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* *38*, 1142–1153.
- Murakami, T., Ockinger, J., Yu, J., Byles, V., McColl, A., Hofer, A.M., and Horng, T. (2012). Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *109*, 11282–11287.
- Newman, A.M., Liu, C.L., Green, M.R., Gentles, A.J., Feng, W., Xu, Y., Hoang, C.D., Diehn, M., and Alizadeh, A.A. (2015). Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat. Methods* *12*, 453–457.
- Pfirschke, C., Engblom, C., Rickelt, S., Cortez-Retamozo, V., Garris, C., Pucci, F., Yamazaki, T., Poirier-Colame, V., Newton, A., Redouane, Y., et al. (2016). Immunogenic chemotherapy sensitizes tumors to checkpoint blockade therapy. *Immunity* *44*, 343–354.
- Rathinam, V.A.K., and Fitzgerald, K.A. (2016). Inflammasome complexes: emerging mechanisms and effector functions. *Cell* *165*, 792–800.
- Riaz, N., Havel, J.J., Makarov, V., Desrichard, A., Urba, W.J., Sims, J.S., Hodi, F.S., Martín-Algarra, S., Mandal, R., Sharfman, W.H., et al. (2017). Tumor and microenvironment evolution during immunotherapy with Nivolumab. *Cell* *171*, 934–949.e15.
- Segovia, M., Louvet, C., Charmet, P., Savina, A., Tilly, G., Gautreau, L., Carretero-Iglesia, L., Bériou, G., Cebrian, I., Cens, T., et al. (2014). Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation. *Am. J. Transplant.* *14*, 1021–1031.
- Sharma, P., and Allison, J. (2015). Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell* *161*, 205–214.
- Sokolovska, A., Becker, C.E., Ip, W.K.E., Rathinam, V.A.K., Brudner, M., Paquette, N., Tanne, A., Vanaja, S.K., Moore, K.J., Fitzgerald, K.A., et al. (2013). Activation of caspase-1 by the NLRP3 inflammasome regulates the NADPH oxidase NOX2 to control phagosome function. *Nat. Immunol.* *14*, 543–553.
- Syn, N.L., Teng, M.W.L., Mok, T.S.K., and Soo, R.A. (2017). De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. *Lancet Oncol.* *18*, e731–e741.
- Woo, S.-R., Fuertes, M., Corrales, L., Spranger, S., Furdyna, M., Leung, M.K., Duggan, R., Wang, Y., Barber, G., Fitzgerald, K., et al. (2014). STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. *Immunity* *41*, 830–842.

## STAR★METHODS

## KEY RESOURCES TABLE

| REAGENT or RESOURCE   | SOURCE                     | IDENTIFIER                          |
|---|----------------------------|-------------------------------------|
| <b>Antibodies</b>   |                            |                                     |
| Goat polyclonal anti-IL-1 $\beta$                                   | R&D Systems                | Cat# AF-401-NA RRID:AB_416684       |
| Control goat IgG  | R&D Systems                | Cat# AB-108-C RRID:AB_354267        |
| Goat anti-mouse IL-17 polyclonal antibody                           | R&D Systems                | Cat# AF-421-NA RRID:AB_354487       |
| Mouse IgG2b anti-CTLA-4   | BioXCell                   | Cat# BE0164 RRID:AB_10949609        |
| Mouse IgG2b isotype control   | BioXCell                   | Cat# BE0086 RRID:AB_1107791         |
| Rat IgG2a anti-PD-1   | BioXCell                   | Cat# BE0146 RRID:AB_10949053        |
| Rat IgG2a isotype control   | BioXCell                   | Cat# BE0089 RRID:AB_1107769         |
| Anti-CD8a depleting antibody YTS 169.4                              | BioXCell                   | Cat# BE0017 RRID:AB_10950145        |
| TCRVb12 (MR11-1)  | BD                         | Cat# 553300 RRID:AB_394768          |
| TCR $\beta$ (H57-597)   | BD                         | Cat# 553174 RRID:AB_398534          |
| TCR $\gamma\delta$ (GL3)  | BD                         | Cat# 553178 RRID:AB_394689          |
| CD27 (LG.3A10)  | BD                         | Cat# 560691 RRID:AB_1727455         |
| CD49b (DX5)   | BD                         | Cat# 553856 RRID:AB_395092          |
| NK1.1 (PK136)   | BD                         | Cat# 557391 RRID:AB_396674          |
| CD4 (RM4-5)   | BD                         | Cat# 558107 RRID:AB_397030          |
| CD8 $\alpha$ (53-6,7)   | BD                         | Cat# 552877 RRID:AB_394506          |
| CD11b (M1/70)   | BD                         | Cat# 553312 RRID:AB_398535          |
| CD11c (HL3)   | BD                         | Cat# 557401 RRID:AB_396684          |
| CD19 (1D3)  | BD                         | Cat# 557398 RRID:AB_396681          |
| CD80 (16-10A1)  | BD                         | Cat# 553769 RRID:AB_395039          |
| CD86 (GL1)  | BD                         | Cat# 553690 RRID:AB_394992          |
| CD107a (1D4B)   | BD                         | Cat# 558661 RRID:AB_1645247         |
| IAb (AF6-120.1)   | BD                         | Cat# 553551 RRID:AB_394918          |
| Ly6C (AL-21)  | BD                         | Cat# 553104 RRID:AB_394628          |
| Ly6G (1A8)  | BD                         | Cat# 551461 RRID:AB_394208          |
| Foxp3 (FJK-16s)   | eBiosciences               | Cat# 17-5773-80 RRID:AB_469456      |
| Rat IgG2a isotype control (eBR2a)                                   | eBiosciences               | 25-4321-81 RRID:AB_470199           |
| Anti-caspase-1 (p20) (mouse)  | Adipogen                   | Cat# AG-20B-0042 RRID:AB_2490248    |
| Anti-IL-1 $\beta$ antibody (H-153)                                  | Santa Cruz Biotechnologies | Cat# sc-7884 RRID:AB_2124476        |
| ROR $\gamma$ t (AFKJS-9)  | eBiosciences               | Cat# 17-6988 RRID:AB_1633425        |
| TMEM176B Polyclonal Antibody  | Proteintech                | Cat# 19825-1-AP<br>RRID:AB_10638313 |
| Anti-LR8 (TMEM176B) antibody  | Abcam                      | Cat# ab103929 RRID:AB_10712259      |
| <b>Biological Samples</b>   |                            |                                     |
| Colon cancer tissue array 90 tumor cases with survival information. | US Biomax, Inc             | Cat# HCol-Ade180Sur-04              |
| <b>Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins</b>                |                            |                                     |
| TRIzol Reagent.   | Invitrogen                 | Cat#15596026                        |
| M-MLV Reverse Transcriptase.  | Invitrogen                 | Cat# 28025013                       |
| Random primers.   | Invitrogen                 | Cat#48190011                        |
| Fast SYBR Green Master Mix.   | Applied Biosystems.        | Cat#4385612                         |
| Lipopolysaccharides from <i>Escherichia coli</i> 0111:B4            | Sigma                      | Cat# L4391                          |
| Nigericin   | Sigma                      | Cat# N7143; CAS:28643-80-3          |
| ATP   | Sigma                      | Cat# 10127531001 CAS: 51963-61-2    |

(Continued on next page)

**Continued**

| REAGENT or RESOURCE   | SOURCE                      | IDENTIFIER  |
|---|-----------------------------|---|
| Iberiotoxin   | Sigma                       | Cat# I5904  |
| Hydroxychloroquine  | Sigma                       | Cat# H0915 CAS: 747-36-4  |
| TEA   | Sigma                       | Cat# T2265 CAS: 56-34-8   |
| (-) BayK8644  | Sigma                       | Cat# B-133 CAS: 98625-26-4  |
| Capsaicin   | Sigma                       | Cat# M2028 CAS: 404-86-4  |
| 1-(1-Adamantyl)ethylamine hydrochloride   | Sigma                       | Cat# 390593 CAS: 1501-84-4  |
| CGP-37157   | Sigma                       | Cat# C8874 CAS: 75450-34-9  |
| Terfenadine   | Sigma                       | Cat# T9652 CAS: 50679-08-8  |
| Nilvadipine   | Sigma                       | Cat# SML0945 CAS: 75530-68-6  |
| TRAM-34   | Sigma                       | Cat# T6700 CAS: 289905-88-0   |
| Picrotoxin  | Sigma                       | Cat# P1675 CAS: 124-87-8  |
| Clotrimazole  | Sigma                       | Cat# C6019 CAS: 23593-75-1  |
| Caspase-1 inhibitor II (Ac-YVAD-CMK)  | Santa Cruz Biotechnology    | Cat# sc-300323 CAS: 178603-78-6   |
| (+)-BayK8644  | Santa Cruz Biotechnology    | Cat# sc-364594 CAS: 98791-67-4  |
| Lipofectamine 2000  | Thermo Fisher               | Cat# 11668027   |
| Fura-2  | Thermo Fisher               | Cat# F1201 CAS: 108964-32-5   |
| DDAO-SE   | Thermo Fisher               | Cat# C34564   |
| Asante NaTRIUM Green-2 AM   | Abcam                       | Cat# Ab142802   |
| FLICA 660 Caspase-1 Assay (FLICA1)  | Immunochemistry             | Cat# 9122   |
| SCREEN-WELL® Ion Channel ligand library   | Enzo Life Sciences          | Cat# BML-2805   |
| <b>Critical Commercial Assays</b>   |                             |   |
| Mouse IL-1 $\beta$ ELISA  | Biologend                   | Cat# 432603   |
| Human IL-1 $\beta$ ELISA  | BD Bioscience               | Cat# 557953   |
| Mouse IL-18 ELISA kit   | MBL                         | Cat# 7625   |
| Amaya Cell Line Nucleofector Kit V  | Lonza                       | Cat# VCA-1003   |
| EnVision+ System- HRP Labelled Polymer  | Dako                        | Cat# K4002  |
| <b>Deposited Data</b>   |                             |   |
| Bulk RNA expression data Riaz cohort  | (Riaz et al., 2017)         | <a href="https://github.com/riazn/bms038_analysis/tree/master/data">https://github.com/riazn/bms038_analysis/tree/master/data</a>                       |
| Normalized single cell expression data.   | (Jerby-Aron et al., 2018)   | GEO: GSE115978  |
| Mendeley dataset  |                             | <a href="https://data.mendeley.com/datasets/publish-confirmation/gvj6fc2b8v/1">https://data.mendeley.com/datasets/publish-confirmation/gvj6fc2b8v/1</a> |
| Normalized NanoString nCounter data   | (Chen et al., 2016)         |   |
| <b>Experimental Models: Cell Lines</b>  |                             |   |
| E.G7-OVA  | ATCC                        | Cat# CRL-2113 RRID:CVCL_3505  |
| MC38  | Kerafast                    | Cat# ENH2040 RRID:CVCL_B288   |
| THP-1   | ATCC                        | Cat# TIB-202 RRID:CVCL_0006   |
| CHO-K1  | ATCC                        | Cat# CCL-61 RRID:CVCL_0214  |
| LL/2 (LLC1)   | ATCC                        | Cat# CRL-1642 RRID:CVCL_4358  |
| CT26.WT   | ATCC                        | Cat# CRL-2638 RRID:CVCL_7256  |
| Melanoma 5555   | Richard Marais' lab         | N/A   |
| <b>Experimental Models: Organisms/Strains</b>   |                             |   |
| Mouse: C57BL/6J   | Institut Pasteur Montevideo | N/A   |
| Mouse: Balb/C   | Institut Pasteur Montevideo | N/A   |
| Mouse: <i>Tmem176b</i> <sup>-/-</sup>   | Cristina Cuturi's lab       | N/A   |
| Mouse: <i>Tmem176b</i> <sup>+/-</sup>   | Cristina Cuturi's lab       | N/A   |
| Mouse: <i>Tmem176b</i> <sup>-/-</sup> <i>Casp1</i> <sup>-/-</sup>                                 | This paper                  | N/A   |
| Mouse: <i>Nlrp3</i> <sup>-/-</sup> (B6.129S6- <i>Nlrp3</i> <sup>tm1Bhk/J</sup> )                  | The Jackson Laboratory      | Cat# 021302 RRID:IMSR_JAX:021302  |
| Mouse: <i>Casp1</i> <sup>1/11</sup> <sup>-/-</sup> (B6N.129S2- <i>Casp1</i> <sup>tm1Fiv/J</sup> ) | The Jackson Laboratory      | Cat# 016621 RRID:IMSR_JAX:016621  |

(Continued on next page)

**Continued**

| REAGENT or RESOURCE  | SOURCE                    | IDENTIFIER  |
|--|---------------------------|---|
| C57BL/6J   | The Jackson Laboratory    | Cat# 000664 RRID:IMSR_JAX:000664  |
| <a href="#">C57BL/6NJ</a>                                      | The Jackson Laboratory    | Cat# 005304 RRID:IMSR_JAX:005304  |
| Oligonucleotides   |                           |   |
| Primers for ROR $\gamma$ t (mRNA) see <a href="#">Table S7</a> | This paper                | N/A   |
| Primers for <i>Il17a</i> , see <a href="#">Table S7</a>        | This paper                | N/A   |
| Primers for <i>Foxp3</i> , see <a href="#">Table S7</a>        | This paper                | N/A   |
| Primers for <i>Tgfb1</i> , see <a href="#">Table S7</a>        | This paper                | N/A   |
| Primers for <i>Il10</i> , see <a href="#">Table S7</a>         | This paper                | N/A   |
| Primers for <i>Irfng</i> , see <a href="#">Table S7</a>        | This paper                | N/A   |
| Primers for <i>Tnfa</i> , see <a href="#">Table S7</a>         | This paper                | N/A   |
| Primers for <i>Ctla4</i> , see <a href="#">Table S7</a>        | This paper                | N/A   |
| Primers for <i>Ccl22</i> , see <a href="#">Table S7</a>        | This paper                | N/A   |
| Primers for <i>Ccl5</i> , see <a href="#">Table S7</a>         | This paper                | N/A   |
| Primers for <i>Il12</i> , see <a href="#">Table S7</a>         | This paper                | N/A   |
| Primers for <i>Il4</i> , see <a href="#">Table S7</a>          | This paper                | N/A   |
| Primers for <i>Gata3</i> , see <a href="#">Table S7</a>        | This paper                | N/A   |
| Primers for <i>Tbx21</i> , see <a href="#">Table S7</a>        | This paper                | N/A   |
| Primers for <i>Cebpb</i> , see <a href="#">Table S7</a>        | This paper                | N/A   |
| Primers for <i>Ccl19</i> , see <a href="#">Table S7</a>        | This paper                | N/A   |
| Primers for <i>Il6</i> , see <a href="#">Table S7</a>          | This paper                | N/A   |
| Primers for <i>Fas</i> , see <a href="#">Table S7</a>          | This paper                | N/A   |
| Primers for <i>Pdl1</i> , see <a href="#">Table S7</a>         | This paper                | N/A   |
| Primers for <i>Tmem176b</i> , see <a href="#">Table S7</a>     | This paper                | N/A   |
| Primers for <i>Gapdh</i> , see <a href="#">Table S7</a>        | This paper                | N/A   |
| Recombinant DNA  |                           |   |
| pcDNA3.1- <i>rTmem176b</i> -GFP                                | Cédric Louvet             | N/A   |
| pcDNA3.1GFP  | José Badano               | N/A   |
| pSecTag2B-PS- <i>Tmem176b</i> -V5His                           | Cédric Louvet             | N/A   |
| pSecTag2b-PS- <i>rTmem176b</i> -2mcherry                       | Cédric Louvet             | N/A   |
| Software and Algorithms  |                           |   |
| FlowJo vX.0.7  | Flowjo, LLC               | N/A   |
| GraphPad Prism 6   | GraphPad Software, Inc.   | N/A   |
| Rmagic 1.3.0   | (Van Dijk D et al., 2018) | <a href="https://github.com/KrishnaswamyLab/MAGIC">https://github.com/KrishnaswamyLab/MAGIC</a> |
| CIBERSORT  | (Newman et al., 2015)     | <a href="https://cibersort.stanford.edu">https://cibersort.stanford.edu</a>                     |

**CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING**

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Marcelo Hill ([mhill@pasteur.edu.uy](mailto:mhill@pasteur.edu.uy)).

**EXPERIMENTAL MODELS AND SUBJECT DETAILS****Animals**

Six-to-ten weeks old male or female C57BL/6 or BALB/c mice were used (Jackson Lab; Bar Harbor, ME) and bred for up to 20 generations at the Institut Pasteur Montevideo or at the Institute of Biology and Experimental Medicine (IBYME), Buenos Aires. All experiments were performed according to local regulation and approved by the Institut Pasteur de Montevideo and by the Institutional Committee for Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL) at IBYME.

*Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice were generated in the 129/SvJ strain and heterozygous mice were backcrossed for 10 generations onto the C57BL/6 background (Janvier, Saint Berthevin, France) as reported (Segovia et al., 2014). *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (B6.129S6-*Nlrp3*<sup>tm1Bhk</sup>/J; 021302) and *Casp1/11*<sup>-/-</sup> (B6N.129S2-*Casp1*<sup>tm1Flv</sup>/J; 016621) were from Jackson Laboratory. *Nlrp3*<sup>-/-</sup> animals were compared to 000664 C57BL/6J, and *Casp1/11*<sup>-/-</sup> mice to 005304 C57BL/6NJ. *Tmem176b*<sup>-/-</sup>*Casp1*<sup>-/-</sup> mice were generated by microinjecting

Crispr/Cas9 targeting *Casp1* in *Tmem176b*<sup>-/-</sup> embryos. F1 animals were genotyped and heterozygous mice were crossed to generate F2 homozygous *Tmem176b*<sup>-/-</sup>*Casp1*<sup>-/-</sup> animals. *Casp1* deficiency was confirmed by Western blot (Figure S1). All animal strains including *Tmem176b*<sup>-/-</sup>, *Tmem176b*<sup>+/+</sup> WT (issued from littermate controls), C57BL/6J, *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, C57BL/JN, *Casp1/11*<sup>-/-</sup> and *Tmem176b*<sup>-/-</sup>*Casp1*<sup>-/-</sup> were bred at a specific pathogen-free animal facility (Institut Pasteur, Montevideo).

### Cell Lines

EG7 (expressing OVA antigen), LL2, CT26, THP-1 and CHO-K1 cell lines were purchased from ATCC (Manassas, VA). MC38 cells were from Kerfast (Boston, MA). The 5555 melanoma cell lines were kindly provided by R. Marais (Cancer Research UK, Manchester) and cultured as described (Hirata et al., 2015).

### Tumor Models and Treatments

C57BL/6 mice were injected s.c with 1 x 10<sup>6</sup> MC38 colon cancer cells, 1 x 10<sup>5</sup> LL2 lung cancer cells, 2.5 x 10<sup>5</sup> 5555 melanoma cells or 1 x 10<sup>6</sup> EG7 thymic lymphoma cells. BALB/C animals were injected with 1 x 10<sup>5</sup> CT26 colon cancer cells. Injection was performed alternating one WT and one *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mouse until completing both groups. In treated animals, alternation was done between drug- and vehicle-treated animals. Tumor growth was measured manually every 2-3 days with a caliper. The two major diameters were taken. Mice were sacrificed when one of the diameters reached 2 cm. In experiments where anti-IL-1 $\beta$ , anti-IL-17A or control IgG were used, 4  $\mu$ g antibody was injected i.p 7 days after inoculation of tumor cells. Injections were repeated every five days until day 27 post-injection or euthanasia. For depletion of CD8<sup>+</sup> T cells, 100  $\mu$ g YTS 169.4 antibody was injected every three days starting from the day before tumor inoculation. Depletion was confirmed in the spleen by flow cytometry. For administration of anti-CTLA-4 mAb or control IgG, 100  $\mu$ g antibody was given i.p starting from day 6 after tumor inoculation. Injections were repeated every three days until day 12. Anti-PD-1 mAb or control IgG was injected (250  $\mu$ g i.p) starting from day 6 and every three days until day 12. BayK8644 or vehicle control (ethanol) was given i.p at 1 mg/kg since day 3 until day 15 after tumor inoculation. In animals treated with BayK8644 and anti-CTLA-4 mAb, BayK8644 was injected at days 3-15 every day and anti-CTLA-4 at days 6, 9 and 12 after tumor inoculation. In mice treated with BayK8644 and anti-PD-1 mAb, treatment with the former started at day 9 and repeated every day until day 21 after tumor inoculation. Anti-PD-1 treatment started at day six after tumor inoculation and repeated every three days until day 12.

### In Vivo Inflammasome Activation

C57BL/6 animals were injected i.p with 20 mg/kg ATP. Four hr later, peritoneal lavage was performed using 5 ml PBS. Peritoneal cells were centrifuged and stained with anti-CD11b, anti-Ly6C and anti-Ly6G antibodies. Cells were analyzed by flow cytometry. The percentage of Ly6C<sup>int</sup> Ly6G<sup>hi</sup> cells within the CD11b<sup>+</sup> cell compartment (neutrophils) was determined. The absolute number of neutrophils was calculated for each condition.

### In Vitro Inflammasome Activation

Bone marrow-derived DCs (BMDCs) were differentiated by culturing bone marrow cells for 8 days in the presence of 0.4 ng/ml GM-CSF. At day 8, adherent cells were >95% CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>MHC II<sup>int</sup>. Cells were stimulated for 3 hr with 0.25  $\mu$ g/ml LPS, washed and treated with the indicated doses of ATP or nigericin. The presence of IL-1 $\beta$  was assessed in culture supernatants by ELISA (Biolegend, 432603). To determine Caspase-1 activation, BMDCs were stained with FLICA1 45 min after ATP or nigericin stimulation and analyzed by flow cytometry. For Western blot, culture supernatants from BMDCs stimulated in the absence of FBS were precipitated with 20 % (v/v) TCA and washed with acetone. Cell lysates were generated with RIPA buffer in the presence of a protease inhibitor cocktail. Cell lysates and precipitates from culture supernatants were electrophoresed, blotted and probed with anti-Caspase-1 (Adipogen, AG-20B-0042) or anti-IL-1 $\beta$  (Santa Cruz Biotechnol, sc-7884) antibodies.

### THP-1 Transfection and Inflammasome Activation

THP-1 monocytes were differentiated into macrophages by treatment with 0.1  $\mu$ M PMA for 48 hr. Macrophages (2.5 x 10<sup>6</sup>) were then detached using trypsin and nucleofected with the GFP or GFP-TMEM176B coding pcDNA1.3 plasmids using the Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V-Lonza and nucleofector device (Amaxa). Sixteen hr later, cells were treated for 3 hr with 0.25  $\mu$ g/ml LPS. Cells were washed and treated for 2 hr with 2.5  $\mu$ M nigericin.

## METHOD DETAILS

### Cytosolic Ca<sup>++</sup> Determination

BMDCs cultured on glass coverslips were loaded with 1  $\mu$ M Fura-2 (ratiometric Ca<sup>++</sup>-sensitive probe) for 45 min in the dark. Cells were then washed and analyzed by time-lapse microscopy at 37°C. Fluorescence emission intensity at 510 nm was determined in individual wells alternating excitation wavelengths of 340 and 380 nm every 3 s. ATP was added when indicated at 0.5 mM.

### In Vivo Cytotoxicity Assay

Splenocytes from naive C57BL/6 mice were stained alternatively with 0.8 (high) or 0.08  $\mu$ M (low) DDAO-SE probe. The high DDAO population was loaded for 60 min at 37°C with 50  $\mu$ M SIINFEKL OVA peptide. After three washes, the high and low population were mixed at 1:1 ratio. The mixed cells (2 x 10<sup>6</sup>) were injected i.v in WT, *Tmem176b*<sup>-/-</sup> or *Tmem176b*<sup>-/-</sup>*Casp1*<sup>-/-</sup> naive or tumor-bearing



mice. Four hr later, mice were sacrificed and the spleens harvested. Splenocytes were analyzed by flow cytometry to assess DDAO high and low populations. Specific cytotoxicity was calculated using the following formula:

$$\% \text{ specific lysis} = (1 - [r_{\text{naive}}/r_{\text{tumor bearing}}]) \times 100$$

$$r = \% \text{DDAO}^{\text{low}} \text{ cells} / \% \text{DDAO}^{\text{high}} \text{ cells}$$

### Screening of TMEM176B Inhibitors

CHO cells were transfected with pSecTag2B-PS-TMEM176A-mCherry and pSecTag2B-PS-TMEM176B-V5His plasmids using Lipofectamine 2000 for 4 hr, washed and cultured for 24 hr. Cells were then loaded with 1  $\mu\text{M}$  ANG-2 for 30 min at 37°C, washed and incubated in 140 mM Na<sup>+</sup>-containing phosphate buffer or 140 mM NMDG to substitute Na<sup>+</sup> in the presence of different doses of tested drugs or vehicle controls. Cells were then analyzed by flow cytometry using a BD Accuri C6 cytometer equipped with a 488 nm laser. ANG-2 emission was detected using a band-pass filter 530/30 and mCherry was determined using a 670 LP filter. FlowJo vX.0.7 software was used for data analysis. MFI from NMDG-containing solutions was subtracted to MFI from Na<sup>+</sup>-containing solutions. A maximum of two drugs was studied in each experiment. Screened drugs were from SCREEN-WELL® Ion Channel ligand library (Enzo Life Sciences; Farmingdale, NY).

### Immunohistochemistry of Human Colon Microarrays

Expression of TMEM176B was analyzed by immunohistochemistry on 90 specimens of human colon tumors (US Biomax, Inc; Rockville, MD). Briefly, antigenic recovery was done by boiling slides in a pressure cooker for 10 min in the presence of alkaline buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.05% Tween 20, pH 9.0). Anti-TMEM176B antibody (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Abcam, ab103929) or control rabbit IgG was incubated ON at 4°C. Staining was verified using EnVision+ System- HRP-labelled polymer anti-rabbit (Dako/Agilent, Santa Clara CA). Slides were counterstained with Meyer's hematoxylin, analyzed by two independent researchers in a blind fashion and categorized as high or low/negative TMEM176B expression in the stroma and parenchyma. Expression levels were then correlated with survival information provided by US Biomax.

### Electrophysiology Experiments

Oocytes were surgically removed from MS222 (0.4%)-anesthetized *Xenopus laevis* female and dissociated under gentle agitation by a 2–3 hr incubation in an OR2 solution (82 mM NaCl; 2 mM KCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM HEPES pH 7.2) supplemented with collagenase 1A (1 mg/ml). Oocytes were then injected with 40 nl of *in vitro* synthesized *Tmem176b* mRNA at 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (mMessage mMachine Ultra kit). *Tmem176b* was fused to a signal peptide sequence (N-terminal) from pSecTag2B (Invitrogen, Carlsbad, CA) and to V5 + 6-His tags (C-terminal). The day after injection, oocytes were placed in a pH 8.0 solution (100 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM HEPES pH 8.0) changed daily. Two to three days later, currents were recorded in two-electrode voltage-clamp using a genclamp500 amplifier (Axon Inst., Foster City, CA) interfaced to a personal computer using the Digidata 1200 interface and the pClamp software (v 7.0; Axon Inst.). Prior to recording, oocytes were incubated in PMA at 0.1  $\mu\text{M}$  in pH 8.0 solution for 20–30 min. Currents were filtered at 100 Hz and digitalized at 0.5 kHz before storage and further analysis. During recording, oocytes were continuously superfused with the pH 8.0 solution. The currents were quantified 5–15 min after holding the extracellular pH at 5.0. In TMEM176B-expressing oocytes, induction of an inward current was obtained by switching to a pH 5.0 solution.

### Quantitative RT-PCR

Total RNA from tumors and lymph nodes was isolated using TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Reverse transcription was performed using M-MLV Reverse Transcriptase and random primers following manufacturer's instructions (Invitrogen). Gene expression was assessed with the Fast SYBR Green Master Mix reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA). Mouse primers used in this study (Table S7) were all designed over different exons to prevent amplification of genomic DNA. Real-time PCR was performed using the ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) or Eco Real-Time PCR System (Illumina). Gene expression was normalized using glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and expressed in arbitrary units using the 2<sup>−ΔΔCt</sup> method.

### Gene Expression Analysis

Normalized NanoString nCounter data were analyzed from Chen et al. (2016). Gene expression data from Riaz et al (2017) were obtained from their GitHub repository ([https://github.com/riazn/bms038\\_analysis/tree/master/data](https://github.com/riazn/bms038_analysis/tree/master/data)). RNA-seq count data were normalized to FPKM (fragment per kilobase per million) through the Bioconductor R package DESeq2 1.18.1. The on-treatment biopsy from patient 32 was excluded from further analyses since it presented extreme expression values.

### CIBERSORT Analysis

The leukocyte signature matrix LM22 (547 genes) which discriminates 22 types of tumor-infiltrating immune cells was used for analysis. Normalized gene expression data from Riaz et al. (2017) cohort were processed with the CIBERSORT web tool (<http://cibersort.stanford.edu/>) setting no quantile normalization and 1,000 permutations as parameters. All samples were run with both relative and

absolute modes. The first mode infers the relative cellular fraction for each cell of the LM22 matrix and the second calculates a score that reflects the absolute proportion of each cell type in the mixture.

### Single Cell RNA-Seq Data Analysis

Normalized single cell expression data from Jerby-Arnon et al. (2018) was obtained from Gene Expression Omnibus (Accession number GSE115978). To study gene correlations, the expression matrix was processed with the software MAGIC (van Dijk et al., 2018) to deal with the undersampling of mRNA known as dropouts. R implementation of the MAGIC algorithm with default parameters (Rmagic v1.3.0) was applied. For correlation analysis, Spearman's Rank Correlation test was used.

### Statistical Analyses

Statistical analyses were performed either by R project or GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Survival analyses were done with the Log-rank (Mantel-Cox) test. Comparison of two experimental conditions was done with paired or unpaired Student's *t* test. Comparison of multiple conditions was done with one or two-way ANOVA tests. Differences in gene expression and CIBERSORT scores between responder and non-responder groups were assessed using the unpaired *t*-test when normality assumption was met. Otherwise, Mann-Whitney *U* test was used. Differences between matched pre- and on-treatment samples were evaluated with paired *t*-test when normality assumption was met or otherwise with Wilcoxon signed-rank test. For correlation analysis, the Pearson coefficient was used when samples passed the normality test. Spearman coefficient was used for all other cases. Shapiro-Wilk test was performed to evaluate the normality assumption for all samples.

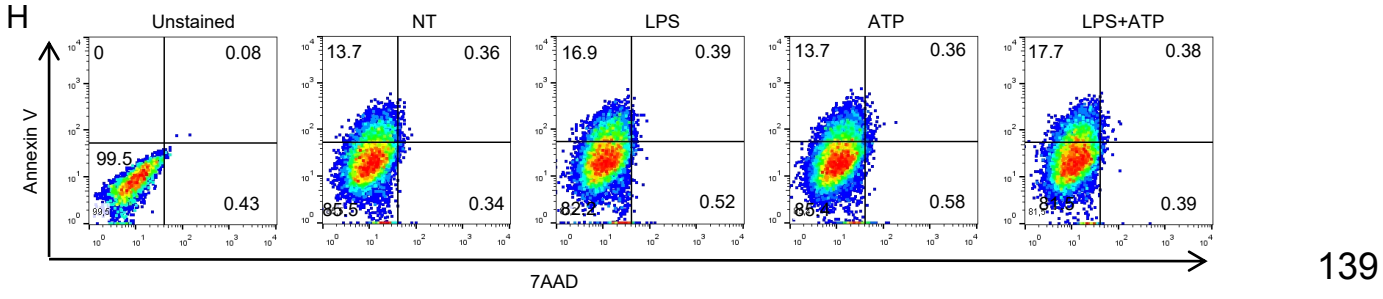
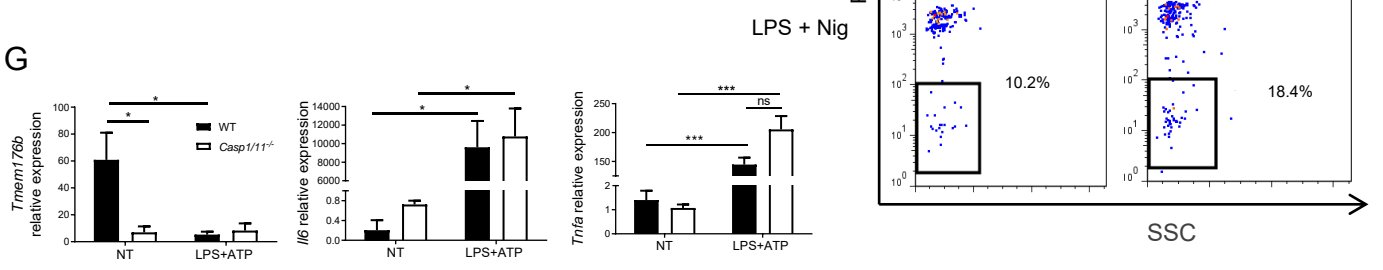
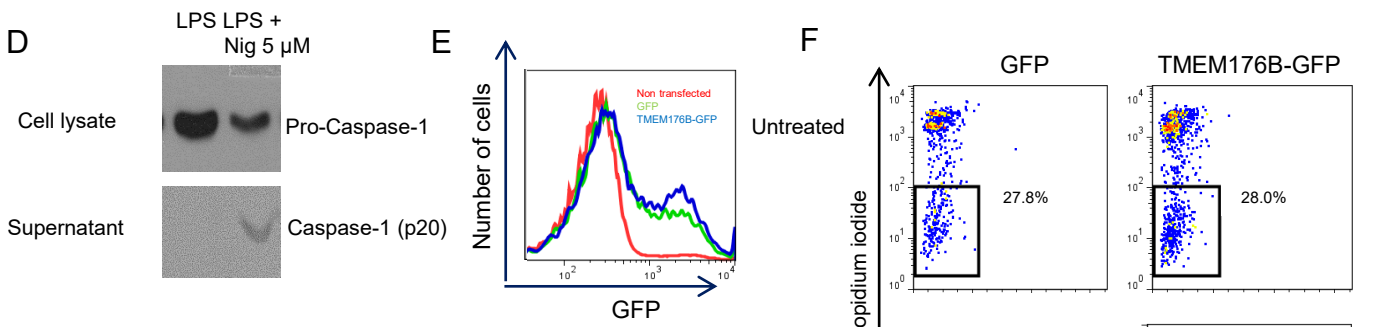
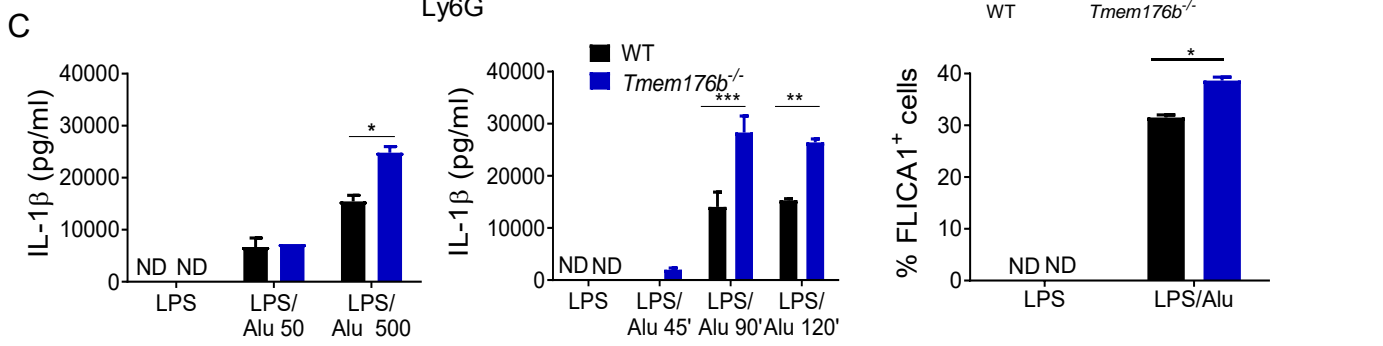
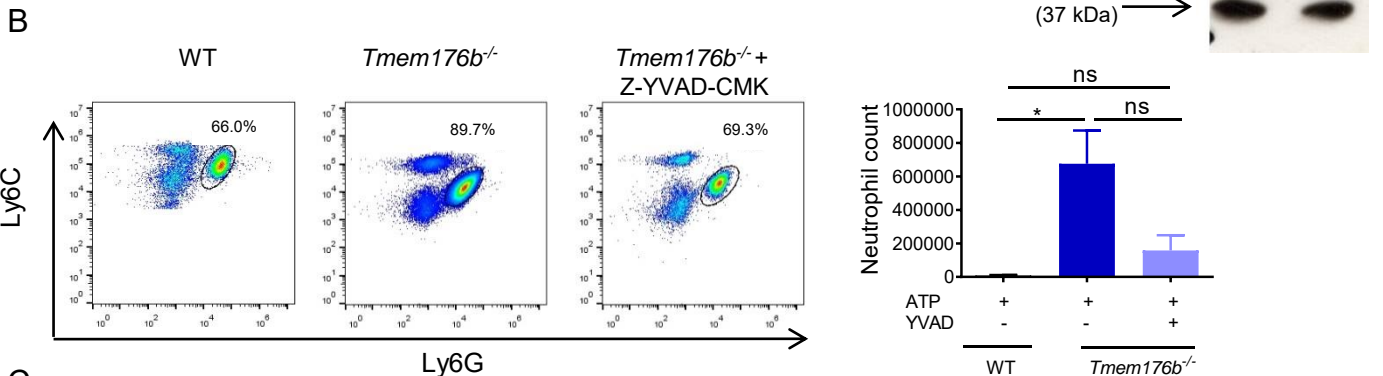
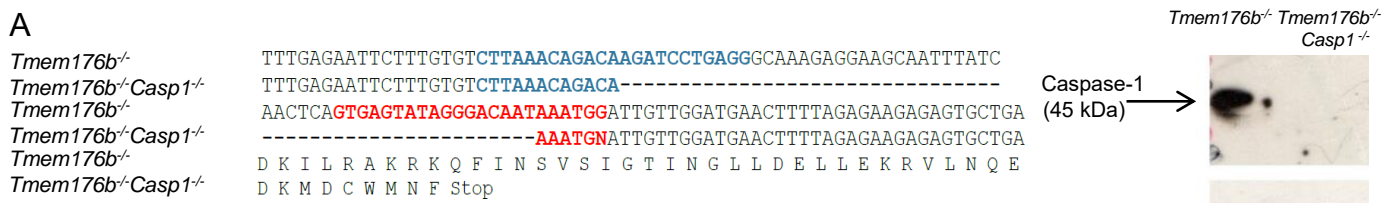
### DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY

Mendeley dataset: <https://data.mendeley.com/datasets/publish-confirmation/gvj6fc2b8v/1>.

**Supplemental Information**

**Targeting TMEM176B Enhances Antitumor Immunity  
and Augments the Efficacy of Immune Checkpoint  
Blockers by Unleashing Inflammasome Activation**

**Mercedes Segovia, Sofia Russo, Mathias Jeldres, Yamil D. Mahmoud, Valentina Perez, Maite Duhalde, Pierre Charnet, Matthieu Rousset, Sabina Victoria, Florencia Veigas, Cédric Louvet, Bernard Vanhove, R. Andrés Floto, Ignacio Anegón, María Cristina Cuturi, M. Romina Girotti, Gabriel A. Rabinovich, and Marcelo Hill**



**Figure S1. Related to Figure 1.**

**(A)** Sequence of genomic DNA (*Casp1* gene) from *Tmem176b*<sup>-/-</sup> and *Tmem176b*<sup>-/-</sup>*Casp1*<sup>-/-</sup> mice. *Tmem176b*<sup>-/-</sup>*Casp1*<sup>-/-</sup> (double KO) mice were generated by deletion of the indicated bases in *Casp1* gene in *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice using the CRISPR/Cas9 strategy. Proteins sequences are shown in the lower part of the alignment. Right: Western blot confirming the absence of Caspase-1 in *Tmem176b*<sup>-/-</sup>*Casp1*<sup>-/-</sup> splenocytes.

**(B)** Absolute number of neutrophils (CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>int</sup>) determined by flow cytometry in 6-8 weeks-old male WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice injected i.p with 20 mg/kg ATP. Four hr after ATP injection, peritoneal lavage was performed. In the plots, CD11b<sup>+</sup> cells were analyzed for Ly6C and Ly6G expression. When indicated, the Caspase-1 inhibitor Z-YVAD-CMK was injected i.p at 5 mg/kg at the time of ATP treatment. At least six animals were studied in each group in two independent experiments. \* p<0.05. ns: non significant. One-way ANOVA test. Representative scatter dot plots (left) and quantification for the different groups (right) are shown.

**(C)** Determination of IL-1 $\beta$  and Caspase-1 activation in WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> bone marrow-derived DCs (BMDCs) treated with LPS (0.25  $\mu$ g/ml) for 4 hr, washed and treated with 500  $\mu$ g/ml of aluminum particles for the indicated times (left). Dose-response experiments are shown in the central graph. Culture supernatants were harvested and IL-1 $\beta$  was determined by ELISA (left and central graphs). Right: Caspase-1 activation was studied by flow cytometry using the FLICA1 reagent. BMDCs were stimulated for 3 hr with LPS and then incubated in the presence or absence of 500  $\mu$ g/ml aluminum particles during 45 min. ND: not detected. \* p<0.05; \*\* p<0.01 One-way ANOVA test. One experiment representative of three is shown.

**(D)** Western blot of Pro-Caspase-1 and Caspase-1 (p20) expression in cell lysates and culture supernatants from WT BMDCs primed for 3 hr with LPS (0.25  $\mu$ g/ml), washed and treated or not with 5  $\mu$ M nigericin (Nig) for 45 min. One experiment representative of two is shown.

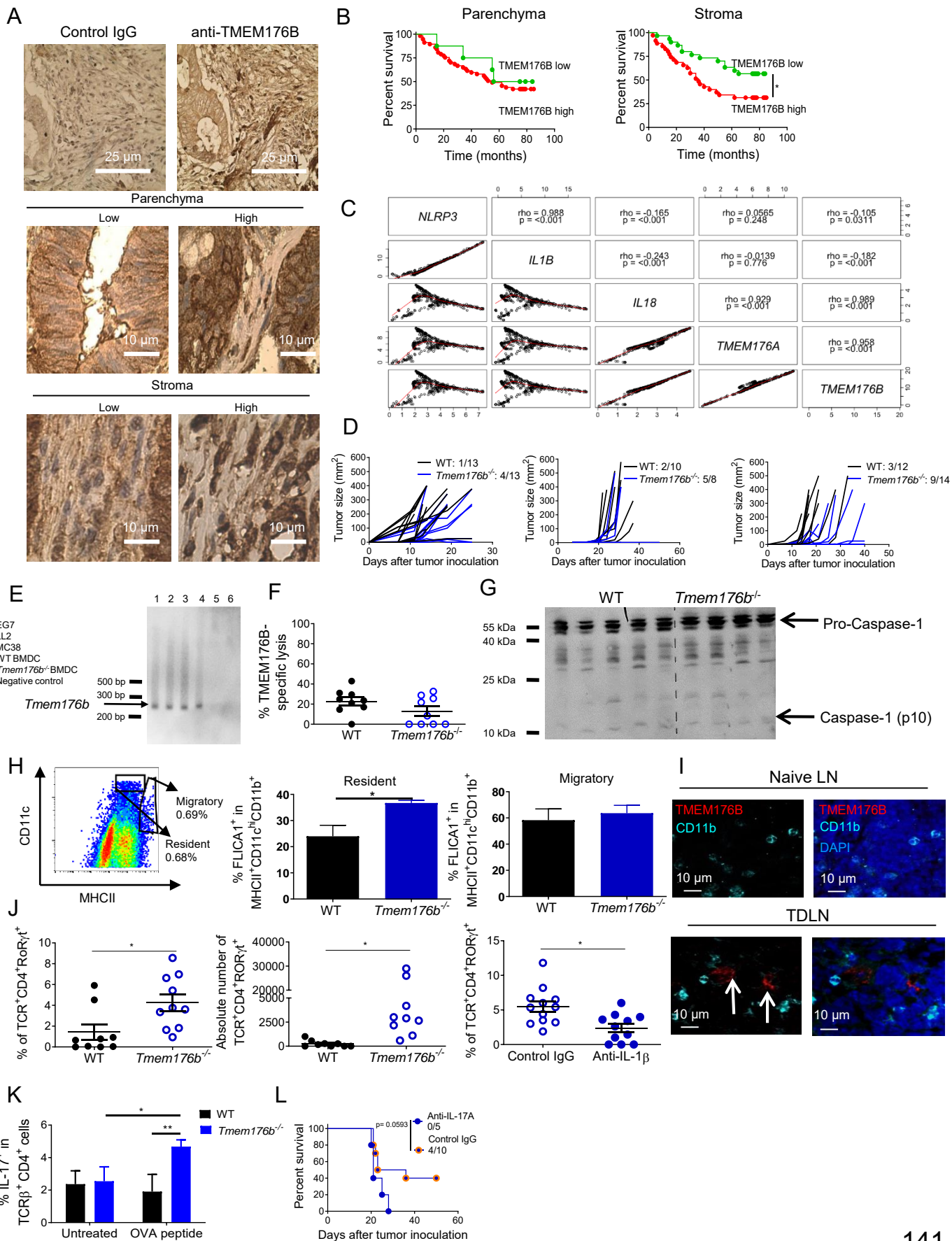
**(E)** Transfection efficiency assessed by flow cytometry. THP-1 cells were differentiated to macrophages by treatment for 48 hr with 0.1  $\mu$ M PMA. Cells were then electroporated with GFP or GFP-TMEM176B coding pcDNA1./8203 plasmids. Sixteen hr later, cells were left untreated or treated for 3 hr with 0.25  $\mu$ g/ml LPS and then exposed for 2 hr to 2.5  $\mu$ M nigericin (Nig).

**(F)** Cell viability assessed by flow cytometry of propidium iodide staining. One experiment representative of three is shown.

**(G)** Contribution of Caspase-1/11 to *Tmem176b*, *Tnfa* and *Il6* mRNA expression. WT and *Casp1/11*<sup>-/-</sup> BMDCs were left untreated (NT) or treated with LPS (0.25  $\mu$ g/ml for 3 hr), washed and exposed to ATP (0.5 mM for 2 hr). *Tmem176b*, *Tnfa* and *Il6* mRNA expression was assessed by qRT-PCR. ns: non significant; \* p<0.05; \*\*\* p<0,001. Two-way ANOVA test.

**(H)** Annexin V/7AAD staining of WT BMDCs either untreated (NT) or treated with LPS, ATP, or LPS plus ATP. The numbers indicate the percentage of cells in each quadrant. Data are representative of two independent experiments.

Mean  $\pm$  SD are shown.



**Figure S2. Related to Figure 2.**

**(A)** Immunohistochemical staining of TMEM176B expression (brown staining, counterstained with hematoxylin) in human colon carcinomas samples (n=90). Representative images for parenchyma and stroma depicting low and high expression are shown. Scale bars, 10 or 25  $\mu\text{m}$ .

**(B)** Survival analysis of colon cancer patients with high or low TMEM176B expression. Association of stromal ( $p=0.0194$ ; Log-rank, Mantel-Cox test) and parenchymal ( $p=0.55$ ; Log-rank, Mantel-Cox test) TMEM176B expression with overall survival. The staining and analysis were done by two independent researchers in a blinded fashion, ignoring the survival data for each sample.

**(C)** Matrix of scatterplots showing correlations between *NLRP3*, *IL1B*, *IL18*, *TMEM176A* and *TMEM176B* gene expression in 420 macrophages from single cell RNA-Seq data from melanoma biopsies (Jerby-Arnon et al., 2018). Correlations were made using Spearman's correlation coefficient. Red lines indicate the local regression (LOESS) fit;  $p$ ,  $p$  value;  $\rho$ , Spearman's correlation coefficient.

**(D)** Growth curves of  $1 \times 10^6$  MC38 colon cancer cells (left),  $1 \times 10^5$  LL2 lung cancer cells (center) or  $1 \times 10^6$  EG7 thymic lymphoma cells (right) s.c injected into WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice. Tumor growth was monitored every three days and measured in its longer and shorter diameters. Mice were euthanized when one of the diameters reached 2 cm. The ratio in the inset shows the number of animals developing tumors over the number of injected animals.

**(E)** *Tmem176b* mRNA expression in tumor cells and BMDCS analyzed by RT-PCR. The 249-bp band corresponds to the expected size of the specific amplified fragment. One experiment representative of two is shown.

**(F)** *In vivo* *Tmem176b*-specific cell lysis assessed as described in the STAR METHODS section. WT naive splenocytes were loaded either with low or high doses of DDAO and injected i.v into tumor-bearing WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> animals 14 days after tumor inoculation. Four hr after injection, spleen was harvested and the ratio of low and high DDAO populations was studied to assess the percentage of specific cytotoxicity. Not significant. Student's *t* test.

**(G)** Analysis of Caspase-1 activation by Western blot comparing tumor lysates from WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> animals. One experiment representative of two is shown.

**(H)** Representative scatter dot plot (left) for MHCII and CD11c expression within TDLN to identify migratory and resident cDCs. The central and right graphs depict the percentage of FLICA1<sup>+</sup> cells (expressing active Caspase-1) within CD11b<sup>+</sup> resident and migratory cDCs respectively from WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> animals. One experiment representative of two is shown. \*  $p < 0.05$  Student's *t* test.

**(I)** Immunostaining of TMEM176B<sup>+</sup> CD11b<sup>int</sup> cells in lymph nodes from naive mice or tumor-bearing animals (TDLN; harvested 14 days after EG7 tumor cell injection). Lymph nodes were immunostained with anti-TMEM176B (red) and anti-CD11b (Cyan) antibodies. Nuclei were stained with DAPI (blue). The white arrows indicate TMEM176B<sup>+</sup> CD11b<sup>int</sup> cells. At least three animals were studied in each group. Scale bars, 10  $\mu\text{m}$ .

**(J)** Flow cytometry of TCR $\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> T cells in TDLN from EG7-bearing WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice. Relative (left) and absolute (central graphic) number of cells are shown. The right graph shows relative cell number of *Tmem176b*<sup>-/-</sup> animals treated with control IgG or anti-IL-1 $\beta$  neutralizing antibody. \*  $p < 0.05$  Student's *t* test.

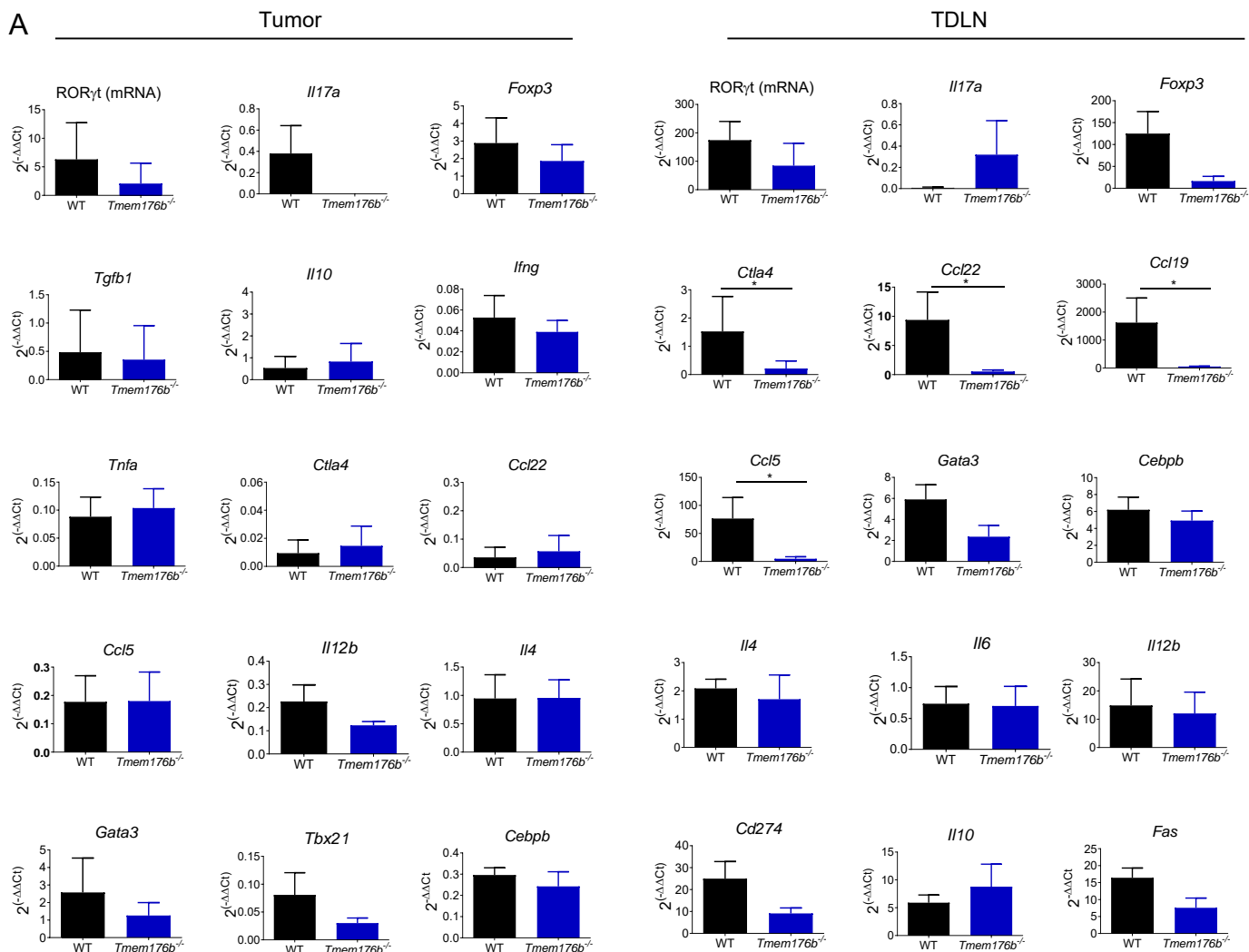
**(K)** Flow cytometry of IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in TDLN cells from EG7-bearing WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice. Animals were euthanized 14 days after tumor cell inoculation. TDLN cells were re-stimulated *in vitro* with 10 μM OVA peptide 323-339 (ISQAVHAAHAEINEAGR) and IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells were determined. One experiment representative of three is shown. \* p<0.05; \*\* p<0.01 Two-way ANOVA test.

**(L)** Survival of EG7-bearing *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice treated with control IgG or anti-IL-17A neutralizing antibody. p=0.0593. Log-rank (Mantel-Cox) test.

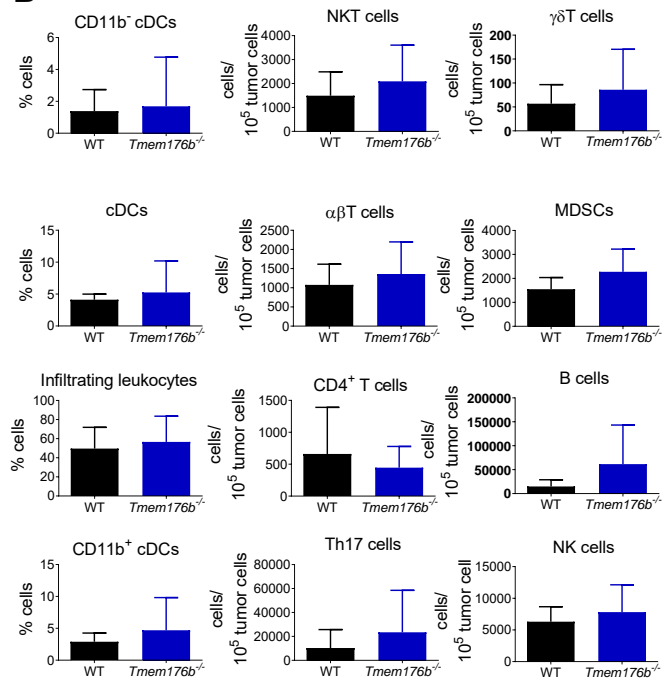
Mean ± SD are shown.



**A**



**B**

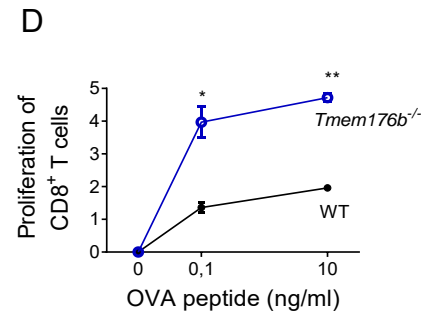
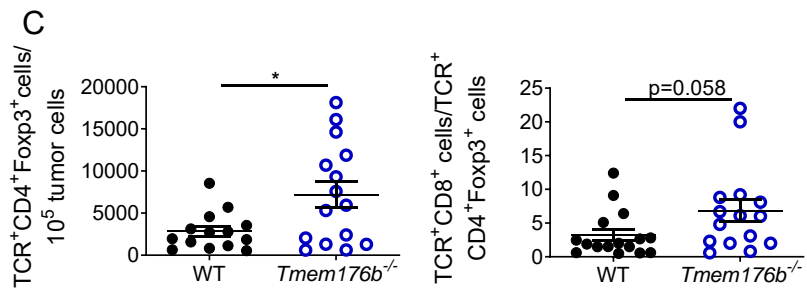
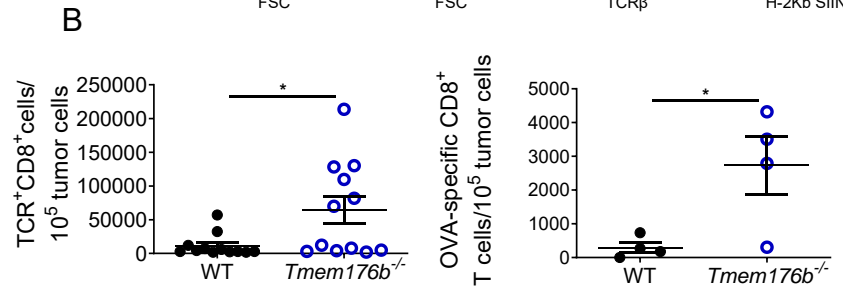
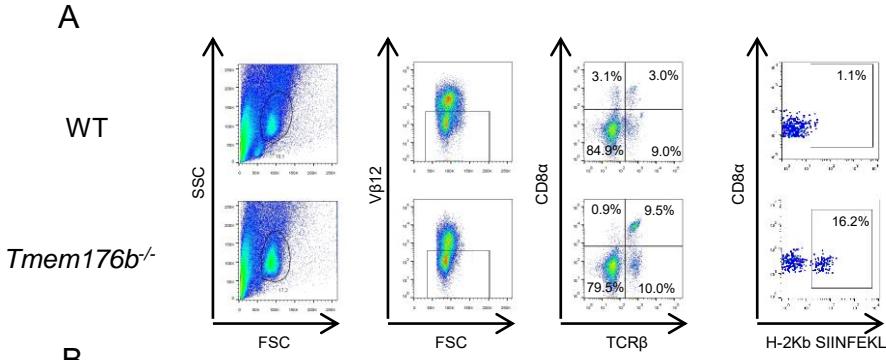


**Figure S3. Related to Figure 2.**

**(A)** Quantitative RT-PCR of the indicated transcripts in EG7 tumors and tumor-draining lymph nodes (TDLN) from WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice harvested 14 days after tumor cell injection (n=5 per group). \* p<0.05 Student's *t* test.

**(B)** Flow cytometry of the indicated markers (CD11b<sup>-</sup> cDCs : TCRVβ12<sup>-</sup> CD11c<sup>hi</sup> MHC II<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup>; cDCs: TCRVβ12<sup>-</sup> CD11c<sup>hi</sup> MHC II<sup>+</sup>; Infiltrating cells: TCRVβ12<sup>-</sup> (EG7 cells are TCRVβ12<sup>+</sup>); CD11b<sup>+</sup> cDCs: TCRVβ12<sup>-</sup> CD11c<sup>hi</sup> MHC II<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>; NKT cells: TCRVβ12<sup>-</sup> TCRβ<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup>; αβT cells: TCRVβ12<sup>-</sup> TCRβ<sup>+</sup>; CD4<sup>+</sup> T cells: TCRVβ12<sup>-</sup> TCRβ<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>; Th17: TCRVβ12<sup>-</sup> TCRβ<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>RORγt<sup>+</sup>; γδT cells :TCRVβ12<sup>-</sup> TCRγδ<sup>+</sup>; MDSCs: TCRβ<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup>; B cells: TCRVβ12<sup>-</sup> TCRβ<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup>; NK cells: TCRVβ12<sup>-</sup> TCRβ<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup>. EG7 tumors from WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice were harvested 14 days after tumor cell injection (at least n=5 per group). Tumors were disaggregated with collagenase D and cell suspensions were stained with the above mentioned antibodies. Data were analyzed by Student's *t* test.

Mean ± SD are shown.



**Figure S4. Related to Figure 2.**

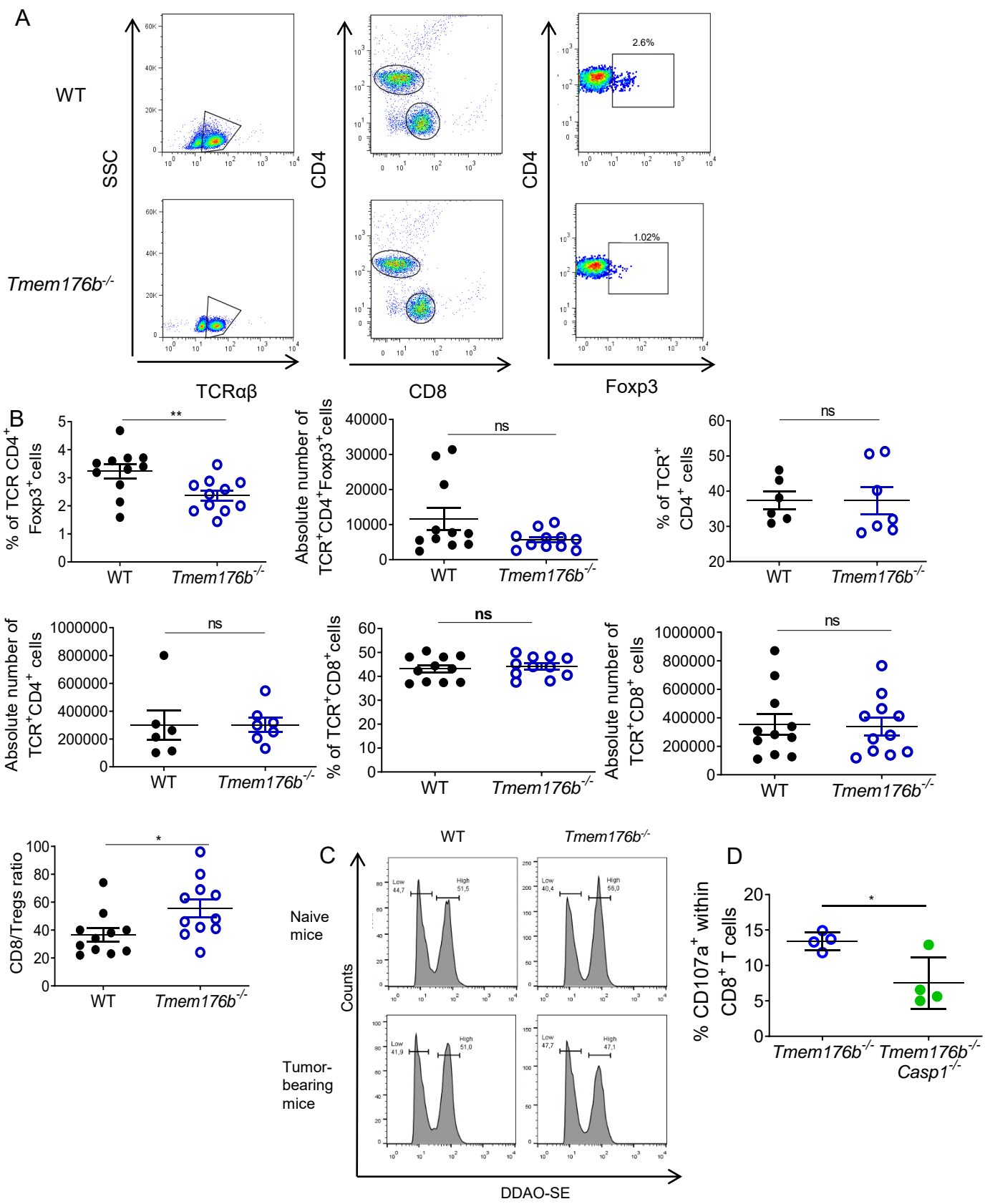
**(A)** Flow cytometry analysis of total and OVA (SIINFEKL peptide)-specific CD8<sup>+</sup> T cells within the tumor microenvironment. TCRVβ12 staining was used to identify tumoral EG7 T cells. Representative of three experiments.

**(B)** Determination of the frequency of total and OVA-specific CD8<sup>+</sup> T cells in WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice studied in A. \* p<0.05 (Student's *t* test).

**(C)** Assessment of intratumoral regulatory T cells (Tregs) and CD8/Treg ratio within the tumor microenvironment. \* p<0.05 (Student's *t* test).

**(D)** Proliferation of CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating T cells assessed by flow cytometry. Tumor-infiltrating T cells were purified by negative selection and re-stimulated *in vitro* in the presence of LPS-treated BMDCs (1/10 ratio) with SIINFEKL peptide. Proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells was determined by flow cytometry by analyzing DDAO dilution. Four WT and four *Tmem176b*<sup>-/-</sup> animals were studied. \* p<0.05; \*\* p<0.01. Student's *t* test.

Mean ± SD are shown.



**Figure S5. Related to Figure 2.**

Tumor-draining lymph nodes from EG7-bearing WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> animals were harvested 14 days after tumor inoculation. Different lymphocyte populations were analyzed by flow cytometry.

**(A)** Representative scatter dot plots indicating the frequency of cells expressing TCR $\alpha\beta$ , CD4, CD8 and Foxp3.

**(B)** Percentage and absolute number of different lymphocyte populations. Student's *t* test. \*  $p < 0.05$ .

**(C)** Representative histograms of *in vivo* T-cell cytotoxicity against OVA-expressing cells shown in Figure 2G.

**(D)** Percentage of CD107a (degranulation marker) studied by flow cytometry within CD8<sup>+</sup> T cells infiltrating tumors in *Tmem176b*<sup>-/-</sup> and *Tmem176b*<sup>-/-</sup>*Casp1*<sup>-/-</sup> mice. \*  $p < 0.05$ . Student's *t* test.

Mean  $\pm$  SD are shown.

**Table S1. Related to Figure 4. Analysis of data from Riaz *et al.* 2017. Paired analysis of inflammasome-associated gene expression profile in non-responders on/pre-treatment (anti-PD-1 antibody). IPI naive patients**

| Gene            | p_value    | fdr        | fc <sup>a</sup> | p_value_log2 | fdr_log2   |
|-----------------|------------|------------|-----------------|--------------|------------|
| <b>TMEM176B</b> | 0.0390625  | 0.46875    | 0.7567829       | 0.029506455  | 0.37796936 |
| <b>TMEM176A</b> | 0.0390625  | 0.46875    | 0.72357185      | 0.048297486  | 0.37796936 |
| <b>CASP4</b>    | 0.06761715 | 0.46875    | 0.3790591       | 0.111900929  | 0.44760372 |
| <b>IL18R1</b>   | 0.08848316 | 0.46875    | -0.42848366     | 0.175189823  | 0.54545455 |
| <b>NLRP6</b>    | 0.09765625 | 0.46875    | 0.64605376      | 0.09765625   | 0.44760372 |
| <b>IL1RN</b>    | 0.12890625 | 0.4921875  | 0.66854228      | 0.062994893  | 0.37796936 |
| <b>IL1RAP</b>   | 0.1640625  | 0.4921875  | 0.3397688       | 0.25         | 0.54545455 |
| <b>IL1R2</b>    | 0.1640625  | 0.4921875  | 0.62915261      | 0.053073014  | 0.37796936 |
| <b>IL1B</b>     | 0.203125   | 0.54166667 | 0.39703187      | 0.31477899   | 0.62955798 |
| <b>CASP5</b>    | 0.25       | 0.54545455 | 0.32829776      | 0.220629385  | 0.54545455 |
| <b>NLRP12</b>   | 0.25       | 0.54545455 | -0.78174959     | 0.25         | 0.54545455 |
| <b>AIM2</b>     | 0.359375   | 0.71875    | 0.3707348       | 0.214068788  | 0.54545455 |
| <b>PYCARD</b>   | 0.43022486 | 0.79426128 | -0.17641233     | 0.477043954  | 0.74553571 |
| <b>GSDMD</b>    | 0.49609375 | 0.85044643 | 0.07568183      | 0.588683156  | 0.74553571 |
| <b>IL18RAP</b>  | 0.58736276 | 0.86979167 | 0.32970506      | 0.577301487  | 0.74553571 |
| <b>SIRT3</b>    | 0.65103296 | 0.86979167 | -0.06294952     | 0.607275156  | 0.74553571 |
| <b>IL1A</b>     | 0.65234375 | 0.86979167 | -0.01555178     | 0.65234375   | 0.74553571 |
| <b>IL18</b>     | 0.65234375 | 0.86979167 | 0.14703032      | 0.55410695   | 0.74553571 |
| <b>ABHD5</b>    | 0.8916341  | 1          | 0.01940535      | 0.786760725  | 0.85828443 |
| <b>CASP1</b>    | 0.91015625 | 1          | 0.20761326      | 0.604608002  | 0.74553571 |
| <b>IL1R1</b>    | 0.93720565 | 1          | -0.02012097     | 0.65234375   | 0.74553571 |
| <b>NLRP7</b>    | 0.94418251 | 1          | 0.16525862      | 0.833634883  | 0.86987988 |
| <b>NLRC4</b>    | 0.95868982 | 1          | 0.01288561      | 0.645871386  | 0.74553571 |
| <b>NLRP3</b>    | 1          | 1          | -0.12646354     | 0.901745055  | 0.90174505 |

a: fc=FC=Log2(on-treatment/pre-treatment)

**Table S2. Related to Figure 4. Analysis of data from Riaz *et al.* 2017. Inflammasome-related gene expression profile at pre-treatment stage (anti-PD-1). Total patients cohort.**

| Gene            | p_value    | fdr        | fc <sup>a</sup> | p_value_log2 | fdr_log2   |
|-----------------|------------|------------|-----------------|--------------|------------|
| <i>IL18</i>     | 0.26886624 | 0.9610583  | -0.06039552     | 0.44313385   | 0.90452546 |
| <i>AIM2</i>     | 0.30215351 | 0.9610583  | -1.18605245     | 0.302153513  | 0.90452546 |
| <i>ABHD5</i>    | 0.30818719 | 0.9610583  | 0.16813754      | 0.382450457  | 0.90452546 |
| <i>NLRP7</i>    | 0.32975435 | 0.9610583  | -0.65461498     | 0.329754349  | 0.90452546 |
| <i>NLRP6</i>    | 0.36689235 | 0.9610583  | -0.39904646     | 0.366892345  | 0.90452546 |
| <i>TMEM176A</i> | 0.43219326 | 0.9610583  | -0.25246754     | 0.511560587  | 0.90452546 |
| <i>TMEM176B</i> | 0.50555314 | 0.9610583  | -0.19952116     | 0.574971819  | 0.90452546 |
| <i>IL1RAP</i>   | 0.51837548 | 0.9610583  | -0.30412707     | 0.403383302  | 0.90452546 |
| <i>IL1R2</i>    | 0.54450591 | 0.9610583  | 0.38787846      | 0.544505907  | 0.90452546 |
| <i>NLRP3</i>    | 0.57126261 | 0.9610583  | -0.195523       | 0.571262605  | 0.90452546 |
| <i>CASP1</i>    | 0.5848672  | 0.9610583  | 0.1042929       | 0.571883087  | 0.90452546 |
| <i>IL1A</i>     | 0.60894254 | 0.9610583  | 0.87696368      | 0.608942545  | 0.90452546 |
| <i>IL1B</i>     | 0.62654098 | 0.9610583  | 0.51189721      | 0.626540976  | 0.90452546 |
| <i>IL1R1</i>    | 0.62654098 | 0.9610583  | 0.50606896      | 0.600290705  | 0.90452546 |
| <i>IL18R1</i>   | 0.63778549 | 0.9610583  | -0.45389818     | 0.437045786  | 0.90452546 |
| <i>IL1RN</i>    | 0.64070554 | 0.9610583  | 1.45651703      | 0.640705535  | 0.90452546 |
| <i>NLRP12</i>   | 0.77138887 | 0.99608145 | 0.65653567      | 0.771388868  | 0.91889441 |
| <i>SIRT3</i>    | 0.78870657 | 0.99608145 | 0.08908715      | 0.530108715  | 0.90452546 |
| <i>CASP5</i>    | 0.80403261 | 0.99608145 | -0.1828214      | 0.804032606  | 0.91889441 |
| <i>NLRC4</i>    | 0.89734932 | 0.99608145 | 0.24808789      | 0.72127875   | 0.91889441 |
| <i>IL18RAP</i>  | 0.91224132 | 0.99608145 | 0.18853179      | 0.912241316  | 0.9592106  |
| <i>GSDMD</i>    | 0.91307466 | 0.99608145 | -0.0650615      | 0.775336521  | 0.91889441 |
| <i>PYCARD</i>   | 0.97625031 | 1          | 0.43830075      | 0.919243494  | 0.9592106  |
| <i>CASP4</i>    | 1          | 1          | 0.04520392      | 1            | 1          |

a: fc=Log2(non responders/responders)



**Table S3. Related to Figure 4. Analysis of data from Riaz *et al.* 2017. Inflammasome gene expression at pre-treatment stage (anti-PD-1). IPI naive patients.**

| Gene            | p_value    | fdr | fc <sup>a</sup> | p_value_log2 | fdr_log2   |
|-----------------|------------|-----|-----------------|--------------|------------|
| <i>IL1RAP</i>   | 0.04919459 | 1   | -0.84507093     | 0.068028757  | 0.97593334 |
| <i>CASP1</i>    | 0.14290646 | 1   | 0.8346638       | 0.215221623  | 0.97593334 |
| <i>IL1R2</i>    | 0.1895867  | 1   | -0.27886838     | 0.189586695  | 0.97593334 |
| <i>ABHD5</i>    | 0.2409666  | 1   | 0.28218828      | 0.336421084  | 0.97593334 |
| <i>NLRC4</i>    | 0.25253619 | 1   | 0.57558152      | 0.427551872  | 0.97593334 |
| <i>PYCARD</i>   | 0.28754702 | 1   | 0.786833        | 0.278688796  | 0.97593334 |
| <i>IL18R1</i>   | 0.44913681 | 1   | 0.06558208      | 0.687783063  | 0.97593334 |
| <i>NLRP6</i>    | 0.51709317 | 1   | -0.31920005     | 0.517093172  | 0.97593334 |
| <i>IL1A</i>     | 0.5180268  | 1   | -1.37787825     | 0.518026796  | 0.97593334 |
| <i>AIM2</i>     | 0.52539868 | 1   | -1.62832169     | 0.285701311  | 0.97593334 |
| <i>IL1R1</i>    | 0.66298319 | 1   | 0.20863927      | 0.525398683  | 0.97593334 |
| <i>NLRP3</i>    | 0.69470252 | 1   | 0.02702505      | 0.694702525  | 0.97593334 |
| <i>IL1B</i>     | 0.69470252 | 1   | -1.04185706     | 0.694702525  | 0.97593334 |
| <i>GSDMD</i>    | 0.69470252 | 1   | -0.01225233     | 0.871411967  | 0.97593334 |
| <i>TMEM176A</i> | 0.73989814 | 1   | -0.25420257     | 0.739898142  | 0.97593334 |
| <i>IL18RAP</i>  | 0.73989814 | 1   | 0.22563589      | 0.739898142  | 0.97593334 |
| <i>NLRP12</i>   | 0.73989814 | 1   | 1.41454798      | 0.739898142  | 0.97593334 |
| <i>CASP5</i>    | 0.78594874 | 1   | -0.32849091     | 0.78594874   | 0.97593334 |
| <i>NLRP7</i>    | 0.92607981 | 1   | -0.18311634     | 0.926079813  | 0.97593334 |
| <i>CASP4</i>    | 0.96607684 | 1   | -0.01321584     | 0.871781457  | 0.97593334 |
| <i>IL1RN</i>    | 0.97593334 | 1   | 0.45616083      | 0.956178957  | 0.97593334 |
| <i>IL18</i>     | 0.97593334 | 1   | 0.46255714      | 0.975933341  | 0.97593334 |
| <i>SIRT3</i>    | 1          | 1   | 0.12306673      | 0.586578059  | 0.97593334 |
| <i>TMEM176B</i> | 1          | 1   | -0.20950591     | 0.749503358  | 0.97593334 |

a: fc=Log2(non responders/responders)

**Table S4. Related to Figure 4. Analysis of data from Riaz *et al.* 2017. Inflammasome gene expression at pre-treatment stage (anti-PD-1). IPI progressors patients.**

| Gene            | p_value    | fdr        | fc <sup>a</sup> | p_value_log2 | fdr_log2   |
|-----------------|------------|------------|-----------------|--------------|------------|
| <b>NLRP7</b>    | 0.11883877 | 0.87847857 | -1.43340439     | 0.118838768  | 0.93807971 |
| <b>IL18</b>     | 0.1981639  | 0.87847857 | -0.41133656     | 0.237145531  | 0.93807971 |
| <b>IL18R1</b>   | 0.27567576 | 0.87847857 | -0.80848563     | 0.193730961  | 0.93807971 |
| <b>PYCARD</b>   | 0.30505426 | 0.87847857 | 0.20522215      | 0.324660564  | 0.93807971 |
| <b>TMEM176A</b> | 0.44302914 | 0.87847857 | -0.0569624      | 0.69003012   | 0.93807971 |
| <b>AIM2</b>     | 0.49979366 | 0.87847857 | -0.75123062     | 0.429215461  | 0.93807971 |
| <b>NLRP12</b>   | 0.53313639 | 0.87847857 | -0.11519728     | 0.533136387  | 0.93807971 |
| <b>TMEM176B</b> | 0.53995284 | 0.87847857 | -0.01448501     | 0.756637021  | 0.93807971 |
| <b>IL1RN</b>    | 0.53995284 | 0.87847857 | 2.1700564       | 0.388204956  | 0.93807971 |
| <b>NLRP3</b>    | 0.60978261 | 0.87847857 | -0.41559361     | 0.609782609  | 0.93807971 |
| <b>NLRP6</b>    | 0.62191817 | 0.87847857 | -0.37938013     | 0.621918166  | 0.93807971 |
| <b>SIRT3</b>    | 0.66060345 | 0.87847857 | 0.09644427      | 0.60716929   | 0.93807971 |
| <b>IL18RAP</b>  | 0.6777879  | 0.87847857 | 0.20423474      | 0.9658985    | 0.9658985  |
| <b>IL1B</b>     | 0.68321676 | 0.87847857 | 2.29490109      | 0.68321676   | 0.93807971 |
| <b>NLRC4</b>    | 0.72110363 | 0.87847857 | -0.02883275     | 0.826361869  | 0.93807971 |
| <b>CASP1</b>    | 0.72110363 | 0.87847857 | -0.17541481     | 0.89899306   | 0.93807971 |
| <b>CASP4</b>    | 0.72110363 | 0.87847857 | 0.15641347      | 0.721103627  | 0.93807971 |
| <b>IL1A</b>     | 0.7546836  | 0.87847857 | 2.81678569      | 0.7546836    | 0.93807971 |
| <b>ABHD5</b>    | 0.75627594 | 0.87847857 | 0.07287696      | 0.756880106  | 0.93807971 |
| <b>IL1R2</b>    | 0.7988051  | 0.87847857 | 0.84095489      | 0.798805099  | 0.93807971 |
| <b>GSDMD</b>    | 0.83902191 | 0.87847857 | -0.05960373     | 0.71436234   | 0.93807971 |
| <b>IL1R1</b>    | 0.87847857 | 0.87847857 | 0.77439692      | 0.828883091  | 0.93807971 |
| <b>IL1RAP</b>   | 0.87847857 | 0.87847857 | 0.17601368      | 0.878478572  | 0.93807971 |
| <b>CASP5</b>    | 0.87847857 | 0.87847857 | -0.04991744     | 0.878478572  | 0.93807971 |

a: fc=Log2(non responders/responders)

**Table S5. Related to Figure 4. Analysis of data from Riaz *et al.* 2017. Inflammasome-related gene expression at on-treatment stage (anti-PD-1). IPI naive patients.**

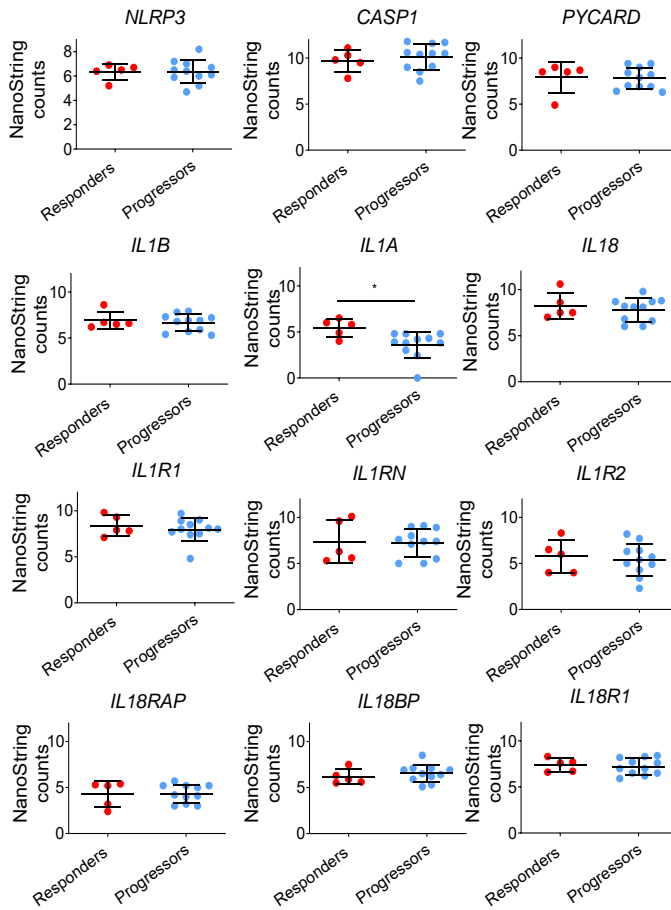
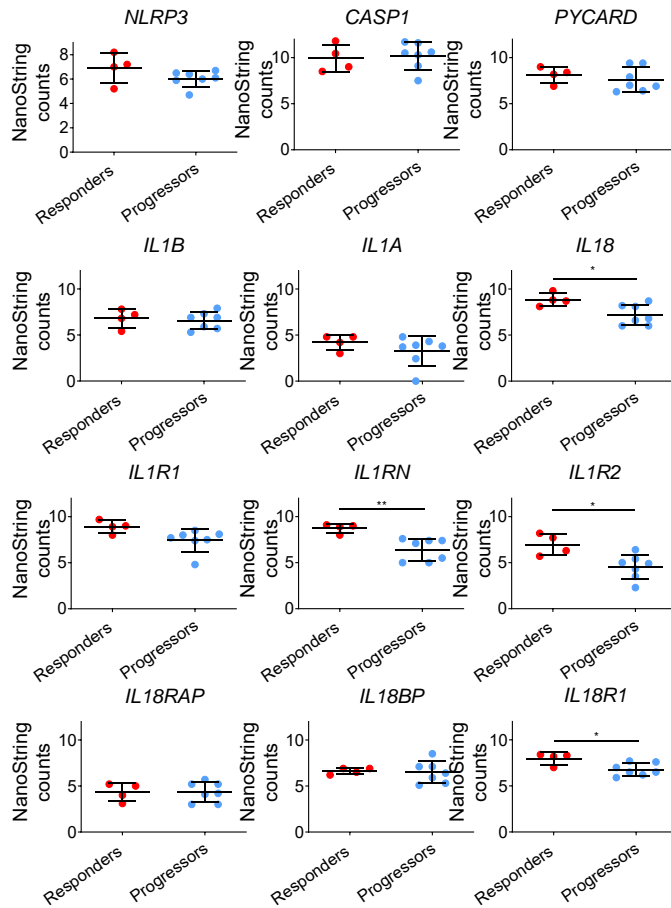
| Gene            | p_value    | fdr        | fc <sup>a</sup> | p_value_log2 | fdr_log2   |
|-----------------|------------|------------|-----------------|--------------|------------|
| <i>TMEM176B</i> | 0,00390625 | 0,0625     | 1,84751874      | 0,00390625   | 0,0625     |
| <i>GSDMD</i>    | 0,00541809 | 0,0625     | 0,63057312      | 0,00541809   | 0,0625     |
| <i>TMEM176A</i> | 0,0078125  | 0,0625     | 1,7844506       | 0,0078125    | 0,0625     |
| <i>NLRP6</i>    | 0,01824504 | 0,07943254 | 0,80397817      | 0,01824504   | 0,07943254 |
| <i>IL18R1</i>   | 0,01890336 | 0,07943254 | 0,88988129      | 0,01890336   | 0,07943254 |
| <i>IL1RAP</i>   | 0,01985814 | 0,07943254 | -0,890935       | 0,01985814   | 0,07943254 |
| <i>IL18RAP</i>  | 0,02734375 | 0,09375    | 1,08256634      | 0,02734375   | 0,09375    |
| <i>CASP1</i>    | 0,0546875  | 0,16193182 | 0,93111062      | 0,0546875    | 0,16193182 |
| <i>IL18</i>     | 0,07344048 | 0,16193182 | 1,17698945      | 0,07344048   | 0,16193182 |
| <i>NLRP7</i>    | 0,07421875 | 0,16193182 | 0,98046218      | 0,07421875   | 0,16193182 |
| <i>IL1R1</i>    | 0,07421875 | 0,16193182 | 0,90803425      | 0,07421875   | 0,16193182 |
| <i>CASP4</i>    | 0,0846027  | 0,1692054  | 0,60492518      | 0,0846027    | 0,1692054  |
| <i>PYCARD</i>   | 0,15770119 | 0,29114067 | 0,60839068      | 0,15770119   | 0,29114067 |
| <i>NLRC4</i>    | 0,25       | 0,42160536 | 0,91383868      | 0,25         | 0,42160536 |
| <i>NLRP3</i>    | 0,26670139 | 0,42160536 | 0,55527122      | 0,26670139   | 0,42160536 |
| <i>CASP5</i>    | 0,28107024 | 0,42160536 | 0,6440894       | 0,28107024   | 0,42160536 |
| <i>AIM2</i>     | 0,30078125 | 0,42463235 | 0,22745745      | 0,30078125   | 0,42463235 |
| <i>IL1A</i>     | 0,359375   | 0,47916667 | 0,67605275      | 0,359375     | 0,47916667 |
| <i>IL1R2</i>    | 0,42578125 | 0,53782895 | 0,82922261      | 0,42578125   | 0,53782895 |
| <i>NLRP12</i>   | 0,5226743  | 0,62720916 | 0,47842529      | 0,5226743    | 0,62720916 |
| <i>ABHD5</i>    | 0,74473826 | 0,85112944 | -0,0715091      | 0,74473826   | 0,85112944 |
| <i>IL1RN</i>    | 0,8203125  | 0,89488636 | 0,98637591      | 0,8203125    | 0,89488636 |
| <i>SIRT3</i>    | 0,97073348 | 1          | 0,00631734      | 0,97073348   | 1          |
| <i>IL1B</i>     | 1          | 1          | 0,92505986      | 1            | 1          |

a:  $fc = \text{Log}_2(\text{non responders}/\text{responders})$

**Table S6. Related to Figure 4. Analysis of data from Riaz *et al.* 2017. Paired analysis of Inflammasome-related gene expression in responders (anti-PD-1) on/pre-treatment stage. IPI naive patients.**

| Gene            | p_value    | fdr        | fc         | p_value_log2 | fdr_log2    |
|-----------------|------------|------------|------------|--------------|-------------|
| <b>IL18R1</b>   | 0,02143359 | 0,51440626 | -0,4859683 | 0,021433594  | 0,51440626  |
| <b>IL1RAP</b>   | 0,12932599 | 0,86453951 | 0,17706561 | 0,129325989  | 0,864539513 |
| <b>NLRP12</b>   | 0,22875214 | 0,86453951 | -0,066435  | 0,228752136  | 0,864539513 |
| <b>NLRP7</b>    | 0,28588144 | 0,86453951 | -0,2509041 | 0,285881445  | 0,864539513 |
| <b>IL1R2</b>    | 0,30379486 | 0,86453951 | 0,16216661 | 0,303794861  | 0,864539513 |
| <b>GSDMD</b>    | 0,30379486 | 0,86453951 | 0,00292277 | 0,303794861  | 0,864539513 |
| <b>ABHD5</b>    | 0,36921692 | 0,86453951 | 0,21108858 | 0,369216919  | 0,864539513 |
| <b>CASP4</b>    | 0,36921692 | 0,86453951 | 0,0423972  | 0,369216919  | 0,864539513 |
| <b>NLRP3</b>    | 0,43614622 | 0,86453951 | -0,1577218 | 0,43614622   | 0,864539513 |
| <b>IL1RN</b>    | 0,44229889 | 0,86453951 | 0,32536957 | 0,442298889  | 0,864539513 |
| <b>IL18RAP</b>  | 0,44229889 | 0,86453951 | 0,16380521 | 0,442298889  | 0,864539513 |
| <b>SIRT3</b>    | 0,46035442 | 0,86453951 | -0,0661062 | 0,460354416  | 0,864539513 |
| <b>IL1B</b>     | 0,46829224 | 0,86453951 | 0,21193413 | 0,468292236  | 0,864539513 |
| <b>IL18</b>     | 0,5508728  | 0,88139648 | -0,0953584 | 0,550872803  | 0,881396484 |
| <b>TMEM176A</b> | 0,5508728  | 0,88139648 | -0,422569  | 0,550872803  | 0,881396484 |
| <b>IL1R1</b>    | 0,60945892 | 0,90792501 | 0,02509495 | 0,609458923  | 0,907925011 |
| <b>NLRC4</b>    | 0,75676165 | 0,90792501 | -0,0565318 | 0,756761647  | 0,907925011 |
| <b>PYCARD</b>   | 0,76602936 | 0,90792501 | -0,4921455 | 0,766029358  | 0,907925011 |
| <b>TMEM176B</b> | 0,79870605 | 0,90792501 | -0,3214791 | 0,798706055  | 0,907925011 |
| <b>CASP1</b>    | 0,79914976 | 0,90792501 | 0,03520439 | 0,799149764  | 0,907925011 |
| <b>AIM2</b>     | 0,80196793 | 0,90792501 | 0,06147296 | 0,801967933  | 0,907925011 |
| <b>NLRP6</b>    | 0,83226459 | 0,90792501 | -0,080559  | 0,832264593  | 0,907925011 |
| <b>IL1A</b>     | 0,88706869 | 0,9256369  | -0,0472519 | 0,887068694  | 0,925636898 |
| <b>CASP5</b>    | 1          | 1          | -0,2518302 | 1            | 1           |

a:  $fc=FC=\log_2(\text{on-treatment/pre-treatment})$

**A****B**

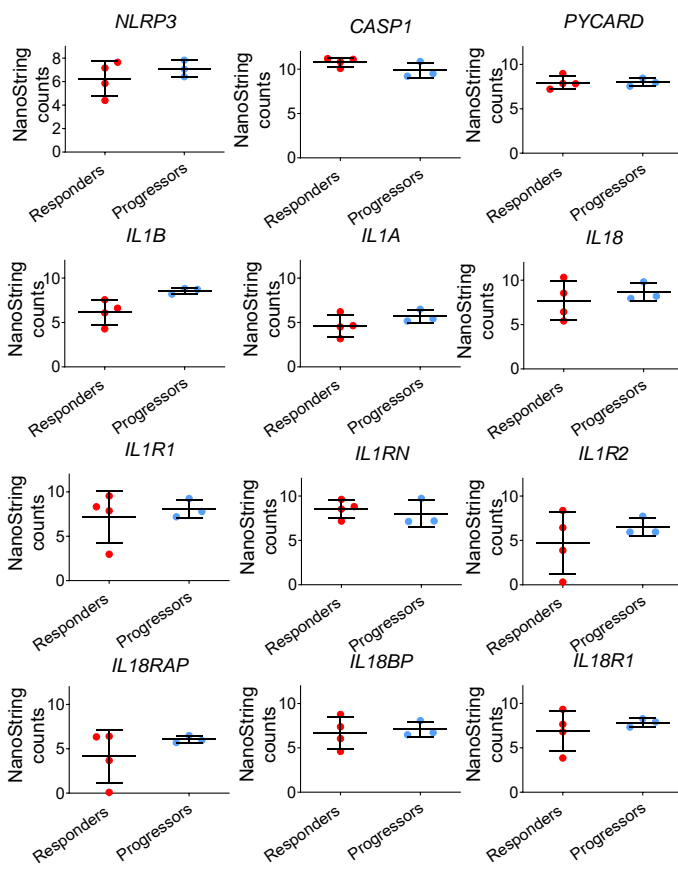
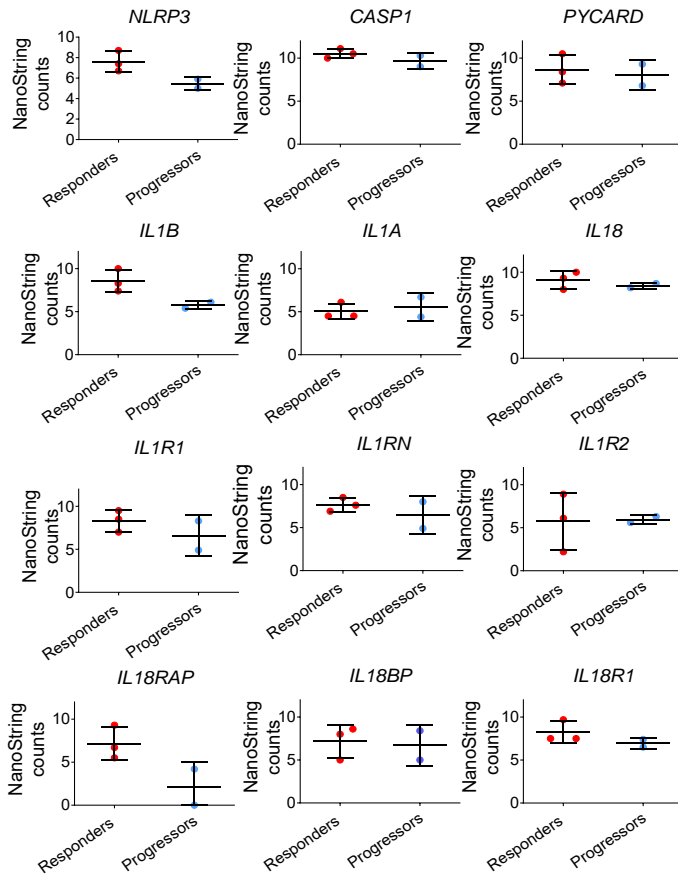
**Figure S6. Related to Figure 5.**

The log<sub>2</sub>-transformed normalized NanoString counts from melanoma tumor biopsies for the indicated inflammasome-related genes is shown (Chen *et al.* 2016 cohort analyzed in Figure 5). Biopsies were obtained before anti-CTLA-4 therapy in A and B.

**(A)** Patients were classified as responders and progressors to anti-CTLA-4 therapy according to clinical outcome as defined by Chen *et al.* (2016). \*  $p < 0.05$ . Non-paired Student's *t* test.

**(B)** Patients progressing to anti-CTLA-4 therapy were then treated with anti-PD-1 antibodies. Based on their clinical outcome (with regards to anti-PD-1 therapy), they were classified as responders and progressors. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ . Non-paired Student's *t* test.

Mean  $\pm$  SD are shown.

**A****B**

**Figure S7. Related to Figure 5.**

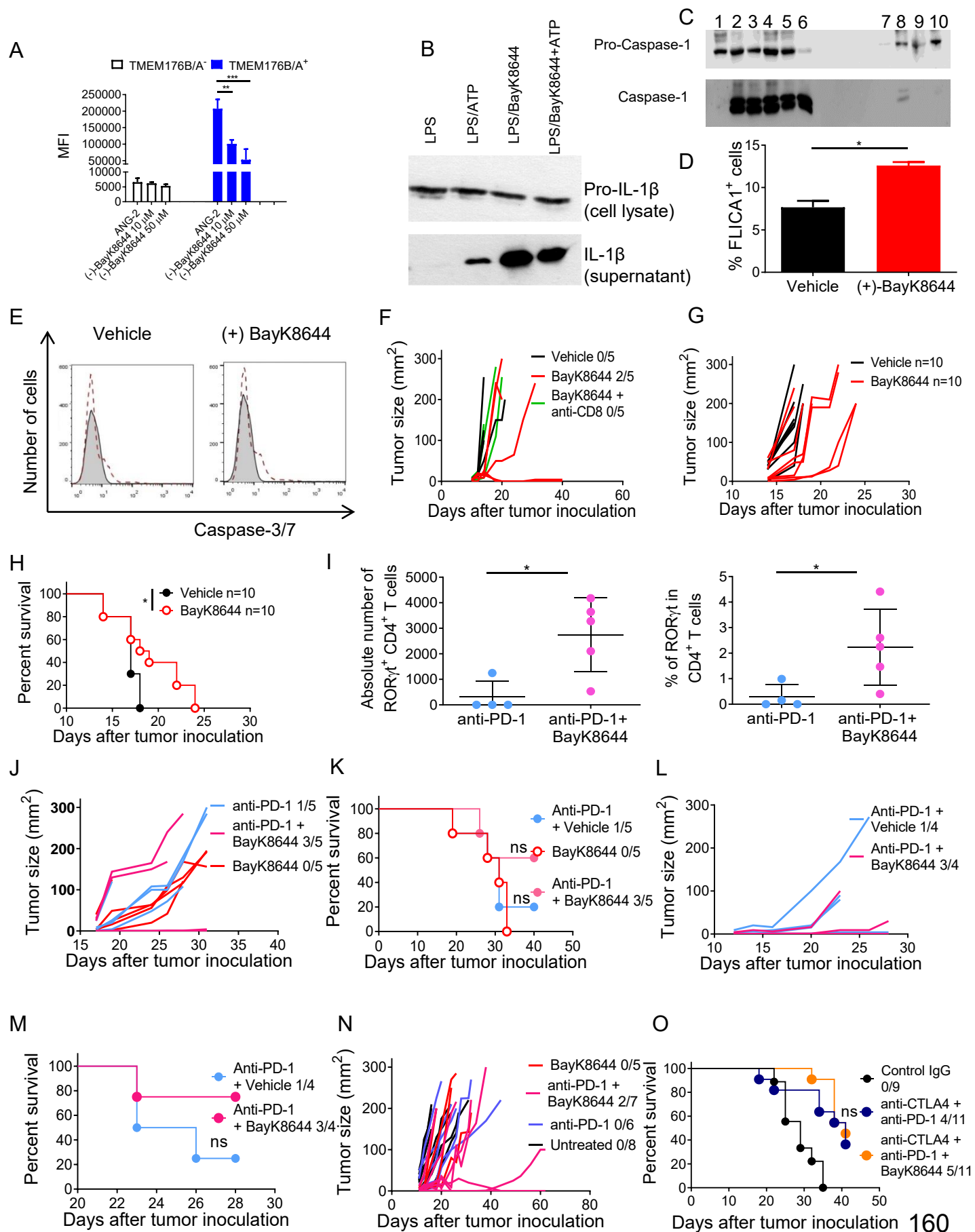
The log<sub>2</sub>-transformed normalized NanoString counts from melanoma tumor biopsies for the indicated inflammasome-related genes is shown for melanoma patients from the Chen *et al.* 2016 cohort analyzed (in Figure 5). Non-paired Student's *t* test.

**(A)** Tumor biopsies were obtained before anti-PD-1 therapy in patients not responding to anti-CTLA-4 antibodies. In the figure, responders and progressors were classified according to their clinical outcome in response to anti-PD-1 therapy.

**(B)** Tumor biopsies were obtained during the anti-CTLA-4 therapy (first 2-3 months). Responders and progressors were classified according to their clinical outcome in response to anti-CTLA-4 therapy.

Mean ± SD are shown.





**Figure S8. Related to Figure 6.**

**(A)** Analysis of BayK8644 activity on TMEM176B/A-transfected cells. CHO-7 cells were transfected with TMEM176B and TMEM176A-mcherry-coding pcDNA1.3 plasmids. Cells were then loaded with the Na<sup>+</sup>-sensitive fluorescent dye Asante NaTRIUM Green 2 (ANG-2). The graph indicates quantification of ANG-2 mean fluorescence intensity (MFI) subtracting in each condition the MFI obtained in Na<sup>+</sup>-free buffer. Untreated and (-) BayK8644-treated cells were studied. One experiment representative of three is shown. \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001. Two-way ANOVA test.

**(B)** Western blot of Pro-IL-1 $\beta$  and IL-1 $\beta$  expression. BMDCs were treated for 3 hr with 0.25  $\mu$ g/ml LPS. Cells were washed and then treated with 2 mM ATP, 2.5  $\mu$ M BayK8644 or both stimuli. Cell lysates and precipitated culture supernatants were electrophoresed, blotted and analyzed using an anti-IL-1 $\beta$  antibody. One experiment representative of four is shown.

**(C)** Western blot analysis of Pro-Caspase-1 and Caspase-1 expression in BMDCs (supernatants) treated as follows. 1: LPS; 2: LPS/ATP; 3: LPS/verapamil + ATP; 4: LPS/nifedipine + ATP; 5: LPS/diltiazem + ATP; 6: LPS/DMSO + ATP; 7: LPS/ATP medium standard K<sup>+</sup>; 8: LPS/BayK8644 medium standard K<sup>+</sup>; 9: LPS/ATP medium high K<sup>+</sup>; 10: LPS/BayK medium high K<sup>+</sup>. One experiment representative of two is shown.

**(D)** Flow cytometry of active Caspase-1 in BMDCs treated with 5  $\mu$ M BayK8644 for 2 hr and then stained with FLICA1. Student's *t* test. \* p<0.05. One experiment representative of three is shown.

**(E)** Number of apoptotic EG7 tumor cells treated *in vitro* with vehicle (ethanol) or with (+) BayK8644 (10  $\mu$ M). Apoptosis was determined by analyzing active caspase-3/7. The grey histogram shows unstained conditions and the dotted line shows caspase-3/7 staining. One experiment representative of three is shown.

**(F)** Growth of EG7 tumor cells inoculated in WT mice treated or not with BayK8644 in the absence or presence of anti-CD8 depleting antibody. Growth of individual tumors is shown.

**(G-H)** Growth of individual tumors (G) and survival (H) of BALB/c mice injected s.c with 1x10<sup>5</sup> CT26 colon cancer cells. Mice were treated daily i.p with vehicle or 1 mg/kg BayK8644 at days 3-15 after tumor cell inoculation. \* p<0.05; Log-rank (Mantel-Cox) test.

**(I)** Absolute number (left) and percentage (right) of TCR $\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> T cells within TDLN from tumor (EG7)-bearing mice treated with anti-PD-1 or anti-PD-1 + BayK8644. Anti-PD-1 antibody (250  $\mu$ g) was injected i.p at days 6, 9 and 12 after tumor inoculation. BayK8644 was injected every day since day 9 (in mice with established tumors) until day 21. \* p<0.05 Student's *t* test.

**(J-K)** Growth of individual tumors (J) and survival (K) of C57BL/6 mice injected s.c with 1 x 10<sup>5</sup> LL/2 lung tumor cells. WT mice were injected with LL/2 cells and then treated with 250  $\mu$ g anti-PD-1 antibody at days 6, 9 and 12 after tumor inoculation. BayK8644 was injected daily since day 9 (tumors were 10-20 mm<sup>2</sup> in surface) until day 21. In this therapeutic protocol BayK8644 monotherapy showed no anti-tumor effect. ns: non significant. Log-rank (Mantel-Cox) test.

**(L-M)** Growth of individual tumors (L) and survival (M) of C57BL/6 mice injected s.c with 1 x 10<sup>6</sup> MC38 colon cancer cells. WT mice were injected with MC38 cells and then treated with 250  $\mu$ g anti-PD-1 antibody at days 6, 9 and 12 after tumor inoculation. BayK8644 was injected daily since day 9 (tumors were 10-20 mm<sup>2</sup> in surface) until day 21. Log-rank (Mantel-Cox) test.

**(N)** Growth of 5555 melanoma cells in WT mice treated or not with anti-PD-1 antibody (days 6, 9 and 12), BayK8644 (days 9-21) or both. All animals had established tumors when BayK8644 treatment was started. Growth of individual tumors is shown.

**(O)** Survival of C57BL/6 mice inoculated s.c with  $2.5 \times 10^5$  5555 melanoma cells and receiving combination treatments. Ten days after tumor cell inoculation, animals were treated with: a) control IgG; b) anti-CTLA-4 mAb + anti-PD-1 mAb or c) anti-CTLA-4 mAb + anti-PD-1 mAb + BayK8644. Mice were sacrificed when one of the tumor diameters reached 2 cm. Mice survival was monitored. Statistical significance was determined using the Log-rank (Mantel-Cox) test. ns: non significant. Control IgG vs anti-CTLA-4 + anti-PD-1  $p= 0.0057$ ; Control IgG vs anti-CTLA-4 + anti-PD-1 + BayK8644  $p<0.0001$ ; anti-CTLA-4 + anti-PD-1 vs anti-CTLA4 + anti-PD-1 + BayK8644, ns.

Mean  $\pm$  SD are shown.

**Table S7. Related to STAR METHODS. List of oligonucleotides.**

| Gene or mRNA    | Primer forward                 | Primer reverse                    |
|-----------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| RORyt (mRNA)    | GGA GGA CAG GGA GCC AAG TT     | AGT AGG CCA CAT TAC ACT GCT       |
| <i>Il17a</i>    | AGT CCA GGG AGA GCT TCA TCT    | TCT TCA TTG CGG TGG AGA GTC       |
| <i>Foxp3</i>    | TCC AAG TCT CGT CTG AAG GC     | GCG AAA GTG GCA GAG AGG TA        |
| <i>Tgfb1</i>    | TGA CGT CAC TGG AGT TGT ACG G  | GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC       |
| <i>Il10</i>     | CCA AGC CTT ATC GGA AAT GA     | TTT TCA CAG GGG AGA AAT CG        |
| <i>Ifng</i>     | TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG    | TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA GAA   |
| <i>Tnfa</i>     | TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC | CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A |
| <i>Ctla4</i>    | CTG AAG GTT GGG TCA CCT GT     | TGG ACT CCG GAG GTA CAA AG        |
| <i>Ccl22</i>    | CAC CCT CTG CCA TCA CGT TT     | CCT GGG ATC GGC ACA GAT AT        |
| <i>Ccl5</i>     | ACT CCC TGC TGC TTT GCC TAC    | GAG GTT CCT TCG AGT GAC A         |
| <i>Il12b</i>    | GGA AGC ACG GCA GCA GAA TA     | AAC TTG AGG GAG AAG TAG GAA TGG   |
| <i>Il4</i>      | GGT CTC AAC CCC CAG CTA GT     | GCC GAT GAT CTC TCT CAA GTG AT    |
| <i>Gata3</i>    | AGG ATG TCC CTG CTC TCC TT     | GCC TGC GGA CTC TAC CAT AA        |
| <i>Tbx21</i>    | GTC TGG GAA GCT GAG AGT CG     | CTT TCC ACA CTG CAC CCA CT        |
| <i>Cebpb</i>    | GGA GAC GCA GCA CAA GGT        | AGC TGC TTG AAC AAG TTC CG        |
| <i>Ccl19</i>    | GAC CTT CCC AGC CCC AAC T      | CGG AAG GCT TTC ACG ATG TT        |
| <i>Il6</i>      | GAG GAT ACC ACT CCC AAC AGA CC | AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT ACA   |
| <i>Fas</i>      | AGT TTC ATG AAC CCG CCT C      | GCA GAC ATG CTG TGG ATC TG        |
| <i>Cd274</i>    | ATG CTC AGA AGT GGC TGG AT     | TGC TGC ATA ATC AGC TAC GG        |
| <i>Tmem176b</i> | ACT CCA GCT AGA ATT GCC ACA G  | CAT CAG CAT CCA CAT CCA CC        |
| <i>Gapdh</i>    | CTA CAG CAA CAG GGT GGT GG     | TAT GGG GGT CTG GGA TGG           |