



Universidad de la República
Facultad de Medicina
Programa para la Investigación Biomédica (ProInBio)

TESIS DE DOCTORADO

Impacto funcional de la inhibición farmacológica de Tmem176b en diferentes subpoblaciones de células dendríticas

MSc. Sabina Victoria Montero

Laboratorio de Inmunoregulación e Inflamación
Institut Pasteur de Montevideo

Tutor: Dr. Marcelo Hill
Co-tutor: Dra. Mercedes Segovia

Tribunal:
Presidente: Dr. Hugo Peluffo.
Vocales: Dra. Cecilia Casaravilla, Dra. Romina Girotti.

Montevideo, Uruguay 2021

Agradecimientos

A la Dra. Cecilia Casaravilla, a la Dra. Romina Girotti, al Dr. Hugo Peluffo por aceptar formar parte del tribunal de esta tesis.

A Marcelo y Mercedes, por el estímulo diario, por compartir el conocimiento, por confiar en mí y darme la oportunidad de trabajar juntos.

A Analía Castro, Helena Pardo y Álvaro Mombrú por la colaboración inter institucional. En especial a Analía por la buena disposición a la hora de sintetizar las nanopartículas.

A Sofía Ruso por el trabajo día a día, por enseñarme con mucha paciencia.

A los compañeros del LIRI (y ex-LIRI): Daniela, Germán, Mauri, Mateo, Marcela, Valentina Alejandro, Javier, Maite.

A los compañeros de PME: Leo, Laura, Mariana y Karina.

A los integrantes de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación.

A la Unidad de Biología Celular por el apoyo técnico durante mi doctorado y por lo aprendido en el área de Citometría de Flujo durante mi estadía en la unidad.

A María Moreno por su apoyo brindado.

A mis queridas: Sofi Viotti, Julia, Karen y Cata.

A la ANII y CAP por el apoyo económico.

Al Institut Pasteur de Montevideo por otorgarme la beca Paulina Luisa, incentivo anual otorgado a las investigadoras del IPMON.

A mis amigas Monic y Vero por el aguante.

A mi familia, pilar imprescindible en mi desarrollo personal.

Índice de contenido

Agradecimientos	2
Resumen.....	6
Lista de abreviaturas	7
Introducción	10
• Cáncer – Inmunidad	10
• Inmunoección del cáncer	11
• Ciclo cáncer- sistema inmune y el rol del microambiente tumoral	15
• Células dendríticas: DCs	18
• Heterogeneidad ontogénica, fenotípica y funcional de las DCs.....	19
• Contribución de las cDC en el contexto de la respuesta inmune anti tumoral.....	30
• Eje: cDC2 – Th17 – respuesta anti tumoral.	32
• Tmem176b como un regulador iónico del inflamasoma NLRP3.....	33
• Inflamasoma NLRP3	37
• Inmunoterapia contra el cáncer	42
• Generalidades	42
• Bloqueadores de Puntos de Control Inmune (BPC)	43
• Nanopartículas en Biomedicina: Nanoterapia	48
• Rol de la Inflamación en la terapia antitumoral.....	52
Objetivos	59
• Objetivos específicos.....	60
Materiales y métodos	61
• Reactivos y Anticuerpos	61
• Animales.....	61

• Cultivo de líneas celulares	61
• Modelos tumorales y tratamientos con NP-BayK8644, eNP o BayK8644 libre.	62
• Cultivo primario de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs).....	62
• Estudio de la presentación cruzada en células dendríticas esplénicas de ratón. ...	63
• Nanopartículas de quitosano (NPs) cargadas con BayK8644 (NP-BayK8644) ó con la sonda 6-coumarin (NP-6cou).....	64
• Captación de NPs por las células detríticas de la médula ósea (BMDC).	67
• Estudios de localización por microscopía confocal	67
• Cuantificación de la Activación Inflammasoma	68
• Análisis ex vivo de células T CD8 ⁺ totales y específicas de antígeno tumoral	69
• Análisis de la expresión génica en el TME por RT-PCR cuantitativa.....	70
• Evaluación in vitro, de la capacidad de las BMDCs de diferenciar células T CD4 ⁺ a un fenotipo Th17.	71
• Evaluación ex vivo, de la capacidad de las cDC2 de diferenciar células T CD4 ⁺ a un fenotipo Th17.	72
• Transferencia adoptiva de células (ACT) con un perfil Th17.....	73
• Citotoxicidad in vivo contra células que expresan el antígeno tumoral	74
• Análisis estadístico	74
Resultados	80
▪ <i>Parte I</i>	80
● <i>El BayK8644 libre inhibe la presentación cruzada de antígeno por las DCs esplénicas in vitro.</i>	80
● <i>Encapsulación del BayK8644 en nanopartículas de quitosano.</i>	82
● <i>Las nanopartículas de quitosano no inhibien la presentación cruzada de antígenos y promueven la activación del inflammasoma NLRP3.</i>	86
● <i>La administración terapéutica con BayK8644 encapsulado en NPs de quitosano aumenta la sobrevida y retarda el crecimiento tumoral en animales de una manera dependiente de Tmem176b.</i>	94

● <i>La infiltración del microambiente tumoral por células T CD8+ totales y específicas de tumor se asocian con la capacidad de control tumoral en animales tratados con NP-BayK8644.</i>	98
● <i>Screening de mecanismos contra-reguladores a nivel intratumoral en animales tratados con BayK8644 encapsulado en NPs de quitosano.</i>	102
▪ <i>Partel II</i>	104
● <i>Las BMDCs derivadas de animales Tmem176b (WT) y Tmem176b^{-/-} poseen un fenotipo de células dendríticas convencionales de tipo 2 (cDC2).</i>	104
● <i>Las BMDCs derivadas de animales Tmem176b^{-/-} poseen mayor capacidad de diferenciar células T CD4⁺ provenientes de animales OT-II a células Th17.</i>	105
● <i>Subpoblaciones de cDC2 residentes de ganglio drenante de tumor (TDLN) provenientes de animales Tmem176b^{-/-} poseen mayor capacidad de diferenciación a células Th17 comparada con cDC2 provenientes de animales WT</i>	107
● <i>La transferencia adoptiva de células con un fenotipo Th17 efector mejora el efecto anti-tumoral de la monoterapia con anticuerpo α-PD1.</i>	113
● <i>La transferencia adoptiva de células con un fenotipo Th17 efector provocó un mayor porcentaje de lisis específica, en un modelo in vivo de animales portadores de tumor y tratados con anticuerpo monoclonal α-PD1.</i>	114
Discusión	116
Conclusión	129
Perspectivas	130
Anexo1	132
Anexo 2.....	176
Referencias Bibliográficas	225

Resumen

Nuestro grupo ha reportado que la proteína Tmem176b es un canal/transportador iónico intracelular fuertemente expresado en células dendríticas (DCs), que bloquea la respuesta inmune anti-tumoral. Identificamos al compuesto BayK8644 como un inhibidor de Tmem176b. BayK8644 promueve el control tumoral en protocolos profilácticos pero no en tumores establecidos a través de la activación del inflammasoma y células T CD8⁺. Entendimos que era necesario profundizar en los mecanismos inmunológicos implicados, con el fin de obtener información que nos permitiera mejorar la respuesta terapéutica. Dada la relevancia de las DCs en la respuesta anti-tumoral y la fuerte expresión de Tmem176b en esos leucocitos, nos planteamos como objetivo general estudiar el impacto de la inhibición de Tmem176b en diferentes sub-poblaciones de DCs (cDC1 y cDC2). Aquí hemos demostrado que la inhibición de Tmem176b con BayK8644 resulta en el bloqueo de una de las funciones más específicas de las cDC1, la presentación cruzada de antígenos. Mostramos que la encapsulación de BayK8644 en NP (NP-BayK8644) previene la inhibición de la presentación cruzada de antígenos mientras mantiene la capacidad de activación del inflammasoma. El tratamiento con NP-BayK8644 de animales que poseen tumores establecidos controló el crecimiento tumoral de una manera dependiente de *Tmem176b*. El control tumoral se asoció con una mayor infiltración tumoral por células T CD8⁺ totales y específicas de tumor. Por tanto, la formulación de BayK8644 en NP mejoró la eficacia antitumoral del compuesto libre al evitar la inhibición de la presentación cruzada de antígenos al tiempo que desencadena la activación del inflammasoma. Por otra parte, caracterizamos mecanismos inmunológicos desencadenados por cDC2 luego de la delección génica y el bloqueo farmacológico de Tmem176b. Mostramos en un modelo *in vitro* y *ex vivo* que las DC2 de animales portadores de tumores *Tmem176b*^{-/-} o WT tratados con BayK8644 promovió la diferenciación de células Th17 de una manera dependiente del inflammasoma. Experimentos de transferencia celular adoptiva mostraron que las células Th17 mejoran los efectos anti-tumorales del bloqueo de PD-1, sugiriendo que el eje cDC2/Th17 podría jugar un papel relevante en la terapia anti-PD-1. En suma, caracterizamos el impacto de la inhibición de Tmem176b en diferentes subpoblaciones de DCs. Ese conocimiento aportó elementos para desarrollar formulaciones que mejoren el efecto anti-tumoral del BayK8644. Además describimos mecanismos desencadenados al inhibir a Tmem176b que potenciarían respuestas inmunes durante la terapia oncológica basada en el bloqueo de PD-1.

Lista de abreviaturas

ACT: transferencia adoptiva de células
ADCC: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
APC: células presentadora de antígeno profesional
ARG1: arginasa 1
ATDCs: DCs tolerogénicas autólogas derivadas del receptor
ATP: adenosina tri fosfato
Bcl-XL: proteína antiapoptótica *B-cell lymphoma-extra large*
BPC: bloqueadores de punto de control
CCL: ligando de quimiocinas C
CCR: receptor de quimiocinas C
CD: cluster de diferenciación
cDC: células dendríticas convencionales
cDC1: células dendríticas convencionales tipo 1
cDC2: células dendríticas convencionales tipo 2
CL: células de Langerhans
CTL: linfocito T citotóxico
CTLA-4: receptor del antígeno 4 del linfocito T citotóxico
DAMPs: patrones moleculares asociados a daño
DCs: células dendríticas
eNP: NPs vacías
EPR: efecto de permeabilidad y retención aumentada
ERGIC: compartimiento intermedio RE-Golgi
FACS: separación celular mediante citometría de flujo
Fas: receptor de muerte, antígeno de superficie asociado a FS-7
FasL: ligando de Fas
Fc: fragmento cristizable de un anticuerpo
FcγRI: tipo I para la fracción Fc de la IgG
FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos
FGF: factor de crecimiento fibroblástico
FLIP: *FADD-like IL-1β-converting enzyme-inhibitory protein*
Flt3L: ligando tirosina quinasa 3 tipo *FMS*
GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos
GTPasa: enzima trifosfatasa de guanosina
GzmB: granzima B
HLA: antígeno leucocitario humano
HPV: virus papiloma humano
IDO: Indoleamina 2,3-dioxygenasa

IFN: interferón
IgG: inmunoglobulina G
IL: interleuquina
iNOS: óxido nítrico sintasa
IRF: factor regulador de interferón
LXR: receptor hepático x
mAb: anticuerpo monoclonal
MDSC: células mieloides supresoras
MICA: glicoproteína secuencia relacionada con polipéptidos MHC de clase I
MIP3 α : proteína inflamatoria de macrófagos 3 alfa
MMP9: metaloproteínasa 9
moDCs : DCs derivadas de monocitos
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NK: células asesinas naturales
NKG2D: proteína de la familia NKG2 de receptores tipo lectina de tipo C
NKT: células T asesinas naturales
NOX2: NADPH oxidase 2
NP-BayK8644: NPs cargadas con BayK8644
NPs: nanopartículas
NSCLC: cáncer de pulmón de células no pequeñas
PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos
PD1: receptor de la proteína 1 de muerte celular programada
pDCs: DCs plasmacitoides
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas
PD-L1: ligando 1 de PD
PEG: poli-etilenglicol
PEI: polietilenoimina
PGA: ácido poli g-glutámico
PGE2: prostaglandina E2
PLG: D,L-láctico-co-glicólico
PLGA (ácido poli-láctico-co-glicólico)
Poly:IC: ácido poliinosínico-policitidílico
PRR: receptores de reconocimiento de patrones
RE: retículo endoplásmico
ROS: especies reactivas de oxígeno
scRNAseq: secuenciación de RNA formato célula única
SHP2: proteína tirosina fosfatasa 2 que contiene homología Src región 2
SIRP α : *Signal Regulatory Protein Alpha* ó CD172 α
STING: estimulador de genes de interferón
TADCs: células dendríticas asociadas a tumores

TAMCs: células mieloides asociadas a tumores
TAMs: macrófagos asociados a tumores
TANs: neutrófilos asociados a tumores
TAP: Transportador asociado con el procesamiento de antígenos
TCF-1: factor de transcripción 1 de células T
TCR: receptor de la célula T
TDLN: ganglios linfáticos que drenan el tumor
TEMs: monocitos que expresan el receptor de angiopoyetina-2 Tie2
TGF- β : factor de crecimiento tumoral β
Th: célula T *“helper”* ó colaboradora
TIL: linfocito infiltrante de tumor
TIM3: *“T cell immunoglobulin and mucin-domain-containing 3”*
TLRs: receptores tipo toll
TME: microambiente tumoral
Tmem176b: *“tolerance-related and induced”* ó TORID
TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa
TRAIL: ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
Treg: célula T reguladora
TSA: antígenos específicos de tumor
UTP: uridina trifosfato
UV: ultravioleta
VEGF: factor de crecimiento vascular
VLPs: partículas tipo virales

Introducción

Como quedó plasmado en el “Resumen”, mi trabajo de tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias Médicas, intentó caracterizar mecanismos celulares y moleculares por los cuales el compuesto BayK844 encapsulado o no en nanopartículas de quitosano desencadena en el hospedero respuestas inmunes contra ciertos tipos de cáncer. En este contexto me gustaría iniciar el apartado “Introducción” describiendo la relación entre el sistema inmune y el cáncer, lo cual me conducirá luego a detallar ciertas células y complejos de proteínas que forman parte del sistema inmune innato del huésped. Esos actores son piezas claves en el desarrollo de estas respuestas antitumorales. Pretendemos con este trabajo de tesis, aportar conocimiento para la obtención de nuevas formulaciones en el área de la Inmunoterapia con el cáncer.

- *Cáncer – Inmunidad*

Se define cáncer como un conjunto de enfermedades con características comunes, las cuales se originan por la acumulación de modificaciones genéticas no letales en una célula que pierde los mecanismos de control de la proliferación y de la supervivencia. Se han descrito más de 200 tipos diferentes de cáncer, que afectan a diferentes tejidos del organismo, y que generan distintos síntomas y en última instancia, tratamientos distintos. Estas desregulaciones en la célula se deben a factores genéticos heredados, o factores externos como: tabaco, alcohol, obesidad, exposición a radiación, etc. Estos factores, pueden generar procesos celulares como: hiperproliferación celular; evasión de factores supresores de crecimiento; invasión y metástasis; inmortalidad replicativa; inducción de angiogénesis y resistencia a la apoptosis. Dichos procesos celulares son conocidos como los sellos distintivos del cáncer (ó “hallmarks”) ^{1,2,3}.

- *Inmunoección del cáncer*

La idea de que el sistema inmunológico puede controlar el cáncer ha sido objeto de debate por más de un siglo y se inició cuando a principios del siglo XX, Paul Ehrlich formuló la hipótesis de que el sistema inmune de un individuo tiene la capacidad de evitar la generación de tumores ⁴. Luego de transcurridos 50 años, Frank MacFarlane Burnet y Lewis Thomas sugirieron la existencia de un "mecanismo de vigilancia inmunológica" contra las células tumorales. Su hipótesis proponía que la inmunidad adaptativa era responsable de prevenir el desarrollo tumoral en huéspedes inmunocompetentes. Este proceso ocurriría a través del reconocimiento de neoantígenos específicos de tumor. Como resultado de este mecanismo se lograba mantener la homeostasis del organismo ^{5,6}. Existen evidencias que apoyan esta hipótesis propuesta por Burnet y Lewis, que provienen tanto de modelos animales como de observaciones clínicas en humanos. En modelos de ratones que poseen una amplia variedad de inmunodeficiencias se observó una alta tasa de incidencia de tumores ⁷. En modelos de trasplante, los tumores son rechazados en hospederos singénicos, mientras que los trasplantes de tejidos normales son tolerados, lo que confirma la existencia de antígenos específicos del tumor ⁸. También las células presentadoras de antígenos profesionales (APCs) tienen la capacidad de procesar y presentar antígenos asociados a tumores a las células del sistema inmune. La presentación de antígenos genera células T de memoria y células efectoras que censan el microambiente en el cuál se generan, en búsqueda de células tumorales ⁹. En diferentes tipos de tumores humanos, incluidos melanoma, cáncer de mama, vejiga, colon, próstata, ovario, recto y glioblastoma, se ha observado una sobrevida prolongada en pacientes con mayor número de linfocitos y células NK ¹⁰⁻¹⁶. Sumado a esto, se ha demostrado que las células T reguladoras (Treg) ejercen efectos tanto perjudiciales como beneficiosos para el huésped ^{17,18}. En suma, el sistema inmune ha evolucionado, al menos en parte, para controlar el crecimiento desmedido de células malignas ^{5,6}.

Estos nuevos datos dieron lugar a la formulación de la teoría de la inmunoección del cáncer descrita por Robert D. Schreiber, que se concibe como un proceso dinámico conformado por tres fases distintas: eliminación, equilibrio y escape, ver Figura 1.

En esta primera fase de eliminación, conocida previamente como la “inmunovigilancia del cáncer”, participan moléculas y células del sistema inmune innato y adaptativo que actúan en estrecha colaboración para detectar la presencia del tumor y destruirlo, antes de que pueda progresar y aparezcan las manifestaciones clínicas de la enfermedad^{19,20}. El sistema inmune podría funcionar como un supresor tumoral extrínseco, eliminando las células tumorales o previniendo su desarrollo. Si en esta fase el tumor es totalmente destruido, la fase de eliminación representa el final del proceso de inmunoección del cáncer²⁰, ver Figura 1.

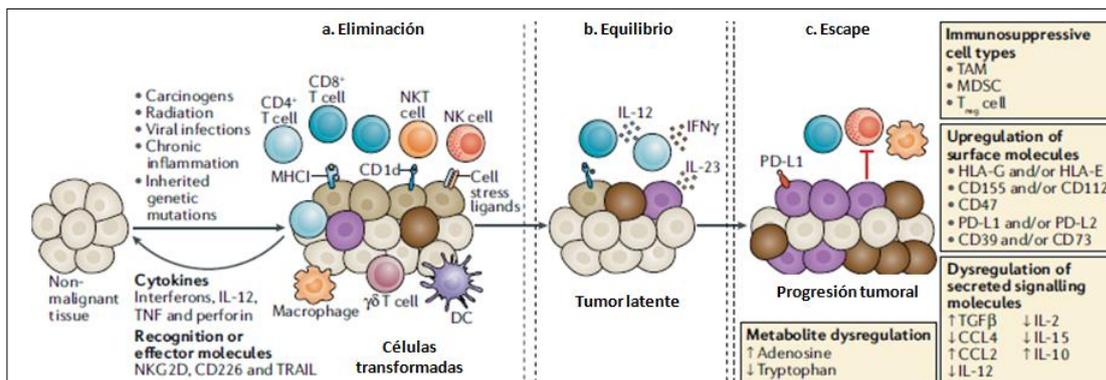


Figura 1. Fases del proceso de inmunoección del cáncer. La inmunoección del cáncer procede a través de tres fases: eliminación, equilibrio y escape. **a)** Durante la fase de eliminación, el sistema inmune innato y adaptativo cooperan para reconocer células transformadas que escaparon de mecanismos de supresión tumoral intrínseca; el objetivo de esta fase es eliminarlas antes de que sean clínicamente detectables. **b)** Las células tumorales que son capaces de sobrevivir a la fase de eliminación entran en la fase de equilibrio, en donde los tumores son moldeados por el sistema inmune. **c)** Cuando el sistema inmune falla en controlar el crecimiento tumoral se entra en la fase de escape, este escape se da por una disminución en la inmunogenicidad de las células tumorales así como por la aparición de un ambiente inmunosupresor. Tomado y modificado de O’Donnell *et al*, 2018.

Sin embargo, el proceso de eliminación puede no ser del todo satisfactorio y el sistema inmune ejercerá un mecanismo de presión de selección, actuando sobre las variantes celulares tumorales que expresan antígenos específicos del tumor (TSA), lo cual facilitará la supervivencia de variantes tumorales menos inmunogénicas²⁰⁻²³. Esto puede ocurrir por una disminución de la capacidad de presentar antígeno debido a la reducción en la expresión de MHC I/II entre otros mecanismos; a un aumento en la expresión de inhibidores de la apoptosis (Bcl-XL, FLIP), expresión de moléculas inhibitorias de la transmisión de señales a través del TCR en linfocitos T CD8⁺ (PD-L1/PD-1, ligando 1 de muerte celular programada), o expresión de moléculas que promueven la muerte de las células T citotóxicas (FasL-Fas).

Asimismo las células tumorales pueden secretar factores que inhiban las funciones efectoras de las células del sistema inmune (TGF- β , IL-10, VEGF, LXR-L,IDO, gangliósidos, o MICA soluble) o son capaces de reclutar Treg y células mieloides supresoras (MDSC) para generar un microambiente inmunosupresor (IL-4, IL-13, TGF- β , IL-10 y PDGF). La secreción de IL-4 e IL-13 conduce al reclutamiento y polarización de los macrófagos M2 a partir de precursores mieloides, los cuales expresan TGF- β , IL-10 y PDGF inhibiendo a las células T. La liberación de factores como IL-1 β , VEGF o PGE2 por las células tumorales lleva a la acumulación de MDSCs que bloquean la acción de las células T. Las células Treg CD4⁺, que expresan altos niveles de los marcadores CD25 (IL-2R α) y del factor de transcripción Foxp3, pueden actuar inhibiendo las funciones citotóxicas de las células T CD8⁺ a través de varias vías, incluyendo la producción de citoquinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- β , y la expresión de moléculas co-inhibidoras como CTLA-4 (proteína 4 asociada con los linfocitos T citotóxicos) y PD-L1, que regulan negativamente la señalización a través del TCR, y disminuyen la proliferación y producción de citoquinas citotóxicas en las células T²⁰.

No obstante, algunas veces el sistema inmune actúa como seleccionador de variantes de células tumorales menos inmunogénicas, que no siendo eliminadas totalmente pueden entrar en una fase de equilibrio o avanzar directamente hacia el escape. Durante la etapa de equilibrio, las células tumorales ingresan en un estado de latencia funcional y pueden permanecer clínicamente indetectables, incluso durante

el resto de la vida del huésped. En ese caso la fase de equilibrio también representa un segundo punto final estable de la inmunoección del cáncer ²². En la clínica se evidencia la existencia de la fase de equilibrio por ejemplo cuando órganos de donantes sanos, pero con tumores en equilibrio, pueden dar lugar a nuevos tumores en los receptores inmunosuprimidos por la ausencia de la presión de selección del sistema inmune del receptor ²⁴.

El estado de equilibrio se puede ver afectado por diferentes variables, tales como la acumulación de nuevas mutaciones en la población de células tumorales poco inmunogénicas que no son afectadas por la inmunoección; o por causa de una disfunción en el sistema inmune como consecuencia de una inmunosupresión. Esta última puede ser consecuencia del proceso de envejecimiento natural, por otras enfermedades o por factores exógenos (drogas, exposición a radiación UV, etc.). En este caso se avanza hacia la tercera fase o escape durante la cual las células tumorales comienzan a crecer de una manera ineficientemente controlada por el sistema inmune y emerge la enfermedad detectable clínicamente. En esta fase de escape, se desencadena una gran variedad de mecanismos celulares que permiten a las células neoplásicas crecer de forma descontrolada, favoreciendo la progresión tumoral y el eventual establecimiento de metástasis, ver Figura 1. Durante esta fase, el microambiente inmune del tumor puede adquirir incluso propiedades reguladoras que contribuyen a crear un microambiente inmunosupresor protumoral ²⁵.

Un tumor no es un simple y homogéneo “grupo” de células malignas, sino que en realidad es algo más parecido a un complejo ecosistema en el que aparecen células tumorales y otros elementos celulares y acelulares. En el siguiente apartado describiré el conjunto de todos los elementos e interacciones que aparecen en el entorno local de una célula dentro de un tumor, que se define como *microambiente tumoral*, y los efectos de este sobre la forma en la que el tumor crece y se disemina.

- *Ciclo cáncer- sistema inmune y el rol del microambiente tumoral*

La respuesta inmune antitumoral es el resultado de un complejo proceso dinámico que se establece entre las células tumorales, las células del sistema inmune y las células del estroma que conforman el microambiente tumoral (TME ó “*tumor microenvironment*”). En 2013, los investigadores Chen y Mellman describieron una serie de eventos, mediante los cuales las respuestas inmunes contra el cáncer conducen a una eliminación eficaz de las células tumorales. Esto se conoce como ciclo Cáncer-Inmunidad ²⁶. Como se mencionó anteriormente, la fase de eliminación del proceso de inmunoedición del cáncer puede comenzar en la etapa 1 de este ciclo, mostrado en la **Figura 2**. El proceso se inicia con la liberación de neoantígenos generados como resultado de una tasa de muerte basal (paso 1). Para que este paso produzca una respuesta de células T contra el cáncer, debe ir acompañado de señales inmunogénicas como por ejemplo citoquinas proinflamatorias y factores que son liberados por la microbiota intestinal o cuando la célula tumoral muere²⁷⁻²⁹. Los antígenos asociados al cáncer son capturados por DCs (paso 2) que, tras migrar a los ganglios linfáticos drenantes de tumor, presentan los antígenos tumorales capturados y son capaces de activar a las células T (paso 3); esto resulta en el cebado y activación de la respuestas de las células T efectoras contra los antígenos específicos del tumor. Estas células efectoras migran (paso 4) y se infiltran en el estroma tumoral (paso 5), donde potencialmente son capaces de reconocer (paso 6) y eliminar las células tumorales (paso 7). Las respuestas citotóxicas mediadas por las células T liberan nuevos antígenos tumorales, lo que alimenta el ciclo de inmunidad contra el cáncer ^{26,30}, ver **Figura 2**.

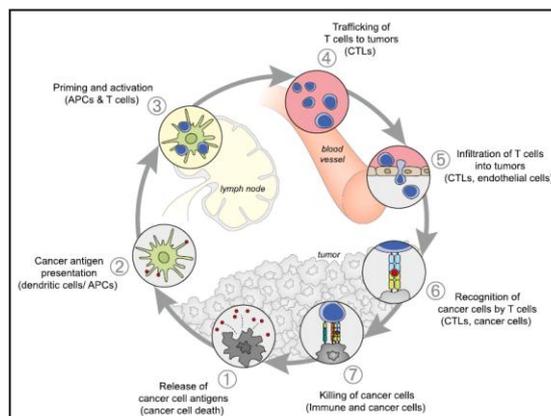


Figura 2. Ciclo de inmunidad al cáncer. La generación de inmunidad contra el cáncer es un proceso cíclico que puede autopropagarse, que en principio debería amplificar y ampliar las respuestas de las células T. Este ciclo se puede dividir en siete pasos (1 a 7), comenzando con la liberación de antígenos de la célula tumoral y terminando con la muerte de dichas células. Tomado y modificado de Chen & Mellman, 2013.

Como se mencionó anteriormente el progreso del ciclo Cáncer-Inmunidad requiere la presencia de señales de activación que le permiten a las DCs madurar, migrar a los ganglios linfáticos y presentar los neoantígenos a las células T vírgenes ³¹. En última instancia, el responsable del crecimiento tumoral, de su capacidad de invasión, del escape inmune por parte del tumor y de la resolución clínica del mismo, es el microambiente tumoral. El TME está compuesto por: células estromales locales, como fibroblastos residentes y, células reclutadas como células endoteliales, células del sistema inmune incluyendo células linfoides y mieloides, células precursoras derivadas de médula ósea, y plaquetas. Cabe destacar que las células mieloides asociadas a tumores (TAMCs) comprenden cinco poblaciones mieloides diferentes: macrófagos asociados a tumores (TAMs), monocitos que expresan el receptor de angiopoyetina-2 Tie2 (TEMs), MDSCs, neutrófilos asociados a tumores (TANs) y células dendríticas asociadas a tumores (TADCs) ³². Además participan todos los mediadores moleculares que secretan estos tipos celulares y que interactúan entre sí polarizando los distintos tipos celulares hacia diversos fenotipos ^{33,34}. Por ejemplo, el comportamiento de los TAMs depende de su fenotipo o estado de activación ³⁵; los TAMs que presentan un fenotipo M1 (proinflamatorio) reaccionan a la presencia de interferón gamma (IFN γ) y secretan citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 1 β (IL-1 β), la interleuquina 12 (IL-12) o el factor de necrosis tumoral alfa (tumor necrosis factor, TNF α) ³⁶; por el contrario, los TAMs con fenotipo M2 (antiinflamatorio) se han asociado a estados inmunosupresores y a la secreción de moléculas inmunosupresoras como la interleuquina 10 (IL-10) ³⁷, la interleuquina 3 (IL-3) ³⁸ o el factor de crecimiento tumoral β (*tumor growth factor β* , TGF- β)³⁹.

Por otro lado, las MDSCs son uno de los grupos de células inmunes con mayor relevancia en el estado del TME. Las MDSC son un grupo heterogéneo de células mieloides que se caracterizan por un estado de inmadurez ontogénica y fuertes capacidades inmunorreguladoras. Dentro de esa heterogeneidad, existen dos subgrupos principales (monocíticas y granulocíticas). Ambos subtipos de MDSCs son capaces de presentar propiedades inmunosupresoras contra los linfocitos CD8⁺ citotóxicos y las células *natural killer* (NKs) mediante la secreción de moléculas inmunosupresoras, incluyendo arginasa 1 (ARG1); óxido nítrico sintasa, (*inducible nitric oxide synthase*, iNOS); TGF-β, IL-10 e Indoleamina 2,3-dioxygenasa (IDO)⁴⁰. Las MDSCs también pueden estimular angiogénesis mediante la producción del factor de crecimiento vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF); del factor de crecimiento fibroblástico (*fibroblastic growth factor*, FGF); y de la metaloproteína 9, MMP-9; entre otros⁴¹) y son capaces de promover procesos metastásicos^{42,43}. La presencia de las MDSCs se ha descrito como abundante en diversos tipos de tumores y se ha asociado al pronóstico desfavorable de los mismos⁴⁴⁻⁴⁷. Las DCs son el tercer gran tipo celular que pertenecen a las células mieloides⁴⁸; se detallará sobre las DCs más adelante en esta tesis.

Por último, y no menos importante, el otro grupo de células inmunes que forman el TME son los linfocitos (TILs), compuestos por linfocitos T (CD4⁺, CD8⁺); linfocitos B y células NK. En la mayoría de los tumores, la presencia de linfocitos y células NK en el tejido tumoral suele asociarse a un pronóstico clínico favorable⁴⁹⁻⁵¹. También se ha descrito la presencia de células T exhaustas en el TME. Las células exhaustas son células T CD8⁺ agotadas, disfuncionales generadas durante infecciones crónicas y cáncer; que pierden su capacidad efectora y expresan receptores inhibidores como PD-1⁵². Dicha población encontrada en el TME combina características de células T exhaustas y de memoria, mostrando un fenotipo único caracterizado por la coexpresión de PD-1 y factor de células T 1 (TCF-1), así como por la falta de expresión de TIM3 ("*T cell immunoglobulin and mucin-domain-containing 3*") y granzima B (GZMB)⁵³.

En suma, las células inmunes en el TME tienen tanto efectos anti- como pro-tumorales. Las respuestas producidas por macrófagos M1, células T citotóxicas,

células Th1, APCs, células NK y células Th9⁵⁴ promueven el rechazo tumoral. Por otro lado, macrófagos M2, células Treg permiten la progresión tumoral⁵⁵. El rol de otras poblaciones celulares en el cáncer es más controvertido, como por ejemplo las células Th17 y las Th2, las cuales tienen reportado roles anti-tumorales como pro-tumorales⁵⁶ y serán discutidas más adelante en esta tesis.

He desarrollado en la Introducción hasta ahora cómo el sistema inmune intenta combatir diferentes tipos de cáncer. En los siguientes apartados me interesa describir un actor relevante de la inmunidad innata, la célula dendrítica (DC). Las DCs son capaces de orquestar respuestas inmunes adaptativas efectoras, al tiempo que disponen de potentes estrategias capaces de regular el desarrollo del proceso inflamatorio y de la respuesta adaptativa. Cabe recordar aquí que nos interesó en esta tesis comprender el impacto de la activación del inflamasoma en diferentes subpoblaciones de DCs.

- *Células dendríticas: DCs*

Las DCs son un grupo heterogéneo de leucocitos que juegan un papel central en la inmunidad innata pero también orquestan las respuestas adaptativas. Constituyen entonces un pivot central entre la inmunidad innata y adaptativa. Son las únicas APCs capaces de estimular células T vírgenes. Además, las respuestas de células T que inducen pueden ser tanto efectoras como reguladoras⁵⁷. Se han desarrollado estrategias en terapias antitumorales teniendo como blanco las DCs, como por ejemplo la administración de antígenos inmunomoduladores que activan las DCs endógenas, así como la generación de vacunas basadas en DCs⁵⁸. Lograr comprender la diversidad y las funciones de los subtipos de DCs y de cómo estos son moldeados por el TME podría lograr beneficios clínicos en la inmunoterapia del cáncer.

Las DCs además de localizarse en lugares diferentes en el organismo (órganos linfoides, tejidos periféricos ó sangre), poseen propiedades de desplazamiento

(migración o no) diferente. En un contexto de cáncer, las condiciones inflamatorias dan lugar a la acumulación de DCs en los tejidos periféricos ⁵⁹. Las DCs inmaduras actúan como células centinela, vigilando la posible entrada de patógenos invasores, los cuales capturan, procesándolos en fragmentos antigénicos. Una vez que se ha capturado el patógeno, la DC inmadura recibe señales de activación, que inician su maduración. Una vez maduras, las DC regulan positivamente la expresión del receptor de quimioquinas CCR7, son atraídas hacia CCL21 (ligando de CCR7), el cual es producido por el endotelio linfático, para migrar desde los tejidos periféricos a las zonas de células T de los ganglios linfáticos drenantes ⁶⁰. En los órganos linfoides secundarios presentan los antígenos procesados a los linfocitos T vírgenes para la inducción de una respuesta inmune específica frente a esos antígenos. La maduración y la migración de las DCs están minuciosamente reguladas por diversas quimioquinas y moléculas de adhesión ^{61,62}.

- ***Heterogeneidad ontogénica, fenotípica y funcional de las DCs***

Actualmente las DCs se clasifican de acuerdo a diferentes factores, como el fenotipo, ontogenia, la firma genética, factores de transcripción críticos para su diferenciación, los receptores tipo toll (TLRs) y otras moléculas funcionalmente relevantes, como receptores de quimioquinas y los receptores de lectina de tipo C, etc. Podemos clasificar a las DCs como DCs de estado estacionario, DCs inflamatorias y CL (células de Langerhans, con un origen embrionario y capacidad de autorenovación)⁶³. Las DCs de estado estacionario pueden clasificarse en DCs convencionales (tipo 1 cDC1 y tipo 2 cDC2) ó DCs mieloides (mDCs) y DCs plasmacitoides (pDCs). Estos subconjuntos se identifican generalmente en base a la falta de expresión de marcadores para las células T, células B, células NK, eritrocitos u otros marcadores específicos de granulocitos, alta expresión de MHC-II y falta de expresión de marcadores de monocitos ⁶³. Todos los subconjuntos de DCs de estado estacionario en ratón

comúnmente expresan CD11c, mientras que en humanos las DC convencionales expresan CD11c, pero las pDC carecen de dicha expresión ⁶³.

Las cDCs derivan de un precursor común específico de DC (pre-cDC), en la médula ósea. Para su desarrollo las cDCs dependen de factores como el Factor Flt3L ("*FMS-like tyrosine kinase 3 ligand*") y el factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF) ^{64,65}. Las pre-cDCs colonizan los tejidos y allí proliferan para formar redes periféricas de DCs.

Las cDC están compuestas por dos grupos principales: residentes y migradoras. Las DCs residentes habitan órganos linfoides secundarios y permanecen allí durante todo su ciclo de vida. Las DCs migradoras están presentes en tejidos periféricos y órganos no linfoides y pueden migrar a través de la linfa hasta los ganglios linfáticos drenantes más cercanos ⁶⁶.

Las DCs derivadas de monocitos (moDCs) ó también llamadas DCs inflamatorias, pueden confundirse fácilmente con cDC2, las cuales presentan un fenotipo CD11b⁺CD172α⁺, en particular porque también expresan CD11b, y cantidades intermedias de IRF-4. Esta discriminación se logra en base a la expresión superficial del receptor CD64, receptor tipo I para la fracción Fc de la IgG o FcγRI ⁶⁷. Este marcador fue utilizado en experimentos de esta tesis, para discriminar las moDCs de las cDC2.

Las cDC1 son el subconjunto de DCs más conocido por su capacidad para estimular respuestas celulares contra patógenos intracelulares y tumores. Las cDC1 son propensas a secretar la citoquina *IL-12p70* polarizante para inducir células T CD4⁺ tipo Th1; pero también son capaces de producir citoquinas reguladoras como TGF-β e IL-10 ⁶⁸. Estas cDC1 son eficientes en realizar la presentación cruzada de antígenos y así logran estimular las células T citotóxicas CD8⁺ ya que expresan proteínas especializadas en las vías de presentación de antígenos que permiten procesar y presentar antígenos exógenos en moléculas MHC-I en la superficie de las DCs ⁶⁹. Estas células **cDC1** de **ratones** expresan **CD11c**, **MHC II**, **CD8α**, **XCR1**, **CLEC9a**, **CD24** y **CD103** y son negativas para **CD172α (SIRPα)** y **CD11b**. En **humanos**, las cDC1 también expresan **CD141 (BDCA-3)**. Las células murinas cDC1 residentes de bazo y ganglios

linfáticos expresan CD8 α . Sin embargo, las cDC1 que residen en tejidos periféricos como pulmón o intestino y que luego migran a ganglios linfáticos expresan la integrina CD103⁶⁸. La expresión del receptor de quimioquinas XCR1 es común a las cDC1 residentes en ganglios linfáticos y a las que migran desde tejidos periféricos⁷⁰. En tejidos no linfoides, todas las cDCs expresan CD24, el cual las distingue de los macrófagos que en su lugar expresan CD64⁷¹. El desarrollo de cDC1 depende de los factores de transcripción IRF8, ID2 y BATF3, y la pérdida de estos factores de transcripción elimina este subtipo de CD^{72,73}.

Desde un punto de vista funcional, muchos trabajos han mostrado que las cDC1 se especializan en estimular células T CD8⁺ mientras que las cDC2 presentan antígenos a los linfocitos T CD4⁺⁷³⁻⁷⁵. Sin embargo, éste dogma ha sido desafiado recientemente por Ferris *et al.*, ya que demostraron en modelos murinos (animales *Xcr1-Cre*) que las cDC1 también pueden activar células T CD4⁺⁷⁶. En el año 2019 Binnewies y colaboradores demostraron en un modelo de cáncer *in vivo* que la inmunidad mediada por células T CD4⁺ dependía de poblaciones de células cDC2-dependientes del factor de transcripción IRF4⁷⁷.

Bosteels y colaboradores demostraron en modelos murinos de inflamación, la existencia de un subtipo de cDC, en un contexto de inflamación, a la cual denominaron “*bona fide* inflammatory cDC2s” ó “inf-cDC2s”. Encontraron una superposición significativa en la expresión de marcadores y factores de transcripción entre cDC2 y MoDCs. Los autores demuestran que las ya conocidas moDCs son una mezcla de las inf-cDC2 y de MoDCs que tienen poca capacidad de migrar y bajo potencial como APC⁶⁷.

Las cDC2 estimulan de forma potente las respuestas de las células T CD4⁺, esto ha sido corroborado con estudios en ratones deficientes de IRF-4, los cuales carecen de cDC2⁶⁷. La función y el desarrollo de cDC2 requieren los factores de transcripción IRF4, RBPJ, KLF4 y RELB^{65,78}. Estas células expresan CD11c, MHC II, CD11b, CD172 α ⁺ (SIRP α) y CD301b⁷⁸. Las células dendríticas cDC2 tanto en humanos como en ratones son CD172 α ⁺ mientras que son negativas para XCR1 y CADM1. CD1c es un marcador de cDC2 en humanos, sin embargo, los ratones carecen de genes CD1c. Las cDC2

murinas son generalmente CD11b⁺CD103⁻, a no ser una subpoblación de intestino que co-expresan CD103 y CD11b en su superficie. Las cDC2 de tejidos murinos no linfoides (pulmón e intestino) son comúnmente CD24⁺. Las cDC2 murinas de bazo también han sido reportadas como que expresan CD4, ESAM, Clec12A, DCIR2⁶⁸.

Inicialmente se describieron los siguientes subtipos de DCs en sangre humana: cDC1 CD141⁺, cDC2 CD1c⁺ y pDC CD123⁺, las cuales son similares a sus contrapartes de ratón en análisis transcripcionales y funcionales^{79,80}. Villani y colaboradores realizaron estudios de RNAseq, que provienen de muestras de sangre humana, e identificaron seis poblaciones de DCs en sangre humana: DC1 corresponde a las cDC1 CD141⁺(BDCA-3⁺)CLEC9A⁺ que tienen la capacidad de realizar la presentación cruzada de antígenos, las DC2 y DC3 corresponden a una subdivisión de las cDC2 (CD1c⁺/BDCA-1⁺), DC4 corresponde a CD1c⁻CD141⁻CD11c⁺CD16⁺ y comparten firmas con los monocitos; DC5 es un subtipo único de DCs, y DC6 corresponde a las pDCs productoras de interferón de tipo I⁸⁰.

Por su parte Brown y colaboradores describieron dos subtipos de cDC2 en modelos murinos, cDC2A (que requieren a Tbet para su diferenciación) y cDC2B (que expresan RORγt). Estos estudios también se demostraron en humanos, dentro de las CD1c⁺ DCs. En sangre humana solo encontraron el subtipo cDC2B. cDC2A estaba presente en tejidos linfoides y no linfoides, mientras que las cDC2B (las cuales abarcan las DCsMgl2⁺) estaban presentes en bazo y LNs drenantes de piel⁸¹.

Bourdely y colaboradores describieron recientemente la existencia de un subtipo de DCs en sangre humana, que llamaron DC3. Las cuales poseen un fenotipo CD88⁻CD1c⁺CD163⁺. Tanto en modelos in vitro, como en modelos in vivo de cancer de mama, estas DC3 poseen capacidad de secretar grandes cantidades de citoquinas y quimioquinas que polarizan las células T, también tienen la capacidad de activar células T CD8⁺CD103⁺CD69⁺⁸². Esto le confiere a este subtipo de DCs la capacidad de modular la respuesta inmune antitumoral.

Las cDC2 humanas pueden realizar la presentación cruzada de antígenos, y producir altos niveles de interleucina (IL) 12, propiedades que se limitan, al menos en parte, al subtipo de cDC1 en ratones⁷⁹.

Se requiere profundizar en estudios con respecto a las cDC2 humanas, ya que según el contexto, las cDC2 humanas pueden inducir la polarización de diversos subtipos de células Th CD4⁺ y también activar las células T CD8⁺ ⁸³⁻⁸⁵. No hay marcadores específicos que identifiquen poblaciones de cDC2 migradoras/residentes en ratones, pero la expresión diferencial de CD11c y MHCII puede usarse como una característica distintiva ⁵⁸. Basado en esta publicación, en este trabajo de tesis cuando se analizaron TDLN por citometría de flujo, se realizó la clasificación de DCs migradoras como MHC^{high}CD11c^{+ / high} y DCs residentes como MHC⁺CD11c^{high}.

En este apartado de mi tesis me interesa profundizar en los mecanismos que poseen las DCs para presentar antígenos a las células T, haciendo hincapié en el mecanismo de “presentación cruzada de antígenos” que será objeto de estudio en los resultados.

Las DCs presentan dos estadios diferentes en fenotipo y función: DCs inmaduras (iDCs) y DC maduras (mDCs). Las iDCs, en estado fisiológico, recorren y sensan los tejidos periféricos, el sistema circulatorio sanguíneo y linfático, y los órganos linfoides secundarios⁶⁵. En la periferia, éstas células captan antígenos a través de macropinocitosis o endocitosis mediada por receptores. Por su parte, las iDCs también se activan indirectamente al reconocer señales de alerta en el microambiente, tales como TNF- α , IL-1 β , PGE-2, etc. o moléculas intracelulares (señales de alerta) provenientes de células necróticas o dañadas (proteínas de shock térmico, ATP, UTP, ácido úrico)⁸⁶. En respuesta a estas señales, las DCs inician su “maduración” a través de la cual se convierten en APC profesionales capaces de activar a linfocitos T vírgenes. Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ expresan receptores que reconocen péptidos antigénicos asociados a moléculas del MHC clase II y clase I, respectivamente.

Durante el proceso de maduración, las DCs reducen su capacidad endocítica a través de una disminución en la expresión de receptores antigénicos, menor capacidad fagocítica y macropinocítica. A diferencia de otras células fagocíticas (como

macrófagos y neutrófilos), las cuales degradan totalmente las moléculas endocitadas; las DCs preservan parcialmente el producto de la endocitosis, mediante la regulación del pH en los compartimentos fagosomales/endosomales ⁸⁷.

Se conocen tres vías de procesamiento antigénico, la vía exógena endocítica, la vía endógena o biosintética y la presentación cruzada de antígenos ⁸⁸. En la **vía exógena**, se procesan los antígenos endocitados. Un conjunto de proteasas se activa a medida que los endosomas disminuyen su pH, las cuales van degradando las proteínas hasta obtener péptidos apropiados para ser ubicados en las moléculas MHC de clase II. Luego de este proceso, el complejo péptido-MHCII puede ser transportado hacia la membrana celular, donde presentará el péptido antigénico a células T CD4⁺. La vía exógena es la utilizada, preferentemente, para la presentación de antígenos provenientes de microorganismos extracelulares, intravesiculares y también para virus con envoltura, que ingresan en el citoplasma luego de transitar por el compartimiento endosomal. Por otra parte, varias proteínas de membrana, sean propias de la célula o provenientes de patógenos intracelulares, también serán procesadas y presentadas por esta vía, al igual que cuerpos apoptóticos y necróticos. Por otro lado, la **vía endógena** es la que procesa la mayoría de los péptidos a ser presentados a las células T CD8⁺ en el contexto de las moléculas MHC de clase I. Estos son generados por el proteasoma, el cual degrada proteínas ubiquitinadas; lo que significa que tanto proteínas propias localizadas a nivel intracelular como provenientes de patógenos que se replican en el citosol, son sometidas a esta forma de procesamiento. Los péptidos resultantes se transfieren al lumen del retículo endoplásmico (RE) mediante transportadores especializados y son unidos, con la ayuda de chaperonas (ej. calnexina y calreticulina), a moléculas MHC de clase I. El bloqueo de la translocación de calreticulina inhibe la expresión de MHC clase II y moléculas coestimuladoras al igual que la capacidad de los linfocitos T CD8⁺ activados de reconocer antígenos tumor específicos ⁸⁹.

Una vez que el péptido se encuentra asociado al MHC I, el complejo migra a través del aparato de Golgi hacia la membrana plasmática. La tercera vía conocida, la **presentación cruzada de antígenos** (Figura 3), surge de la intersección de las vías endógena y exógena. Esta vía se requiere con el objetivo de iniciar una respuesta

inmune citotóxica contra tumores, bacterias intravesiculares, virus, como también para mantener la tolerancia a autoantígenos. La presentación de antígenos tumorales por parte de las APCs es un proceso clave en el inicio de la inmunidad antitumoral.

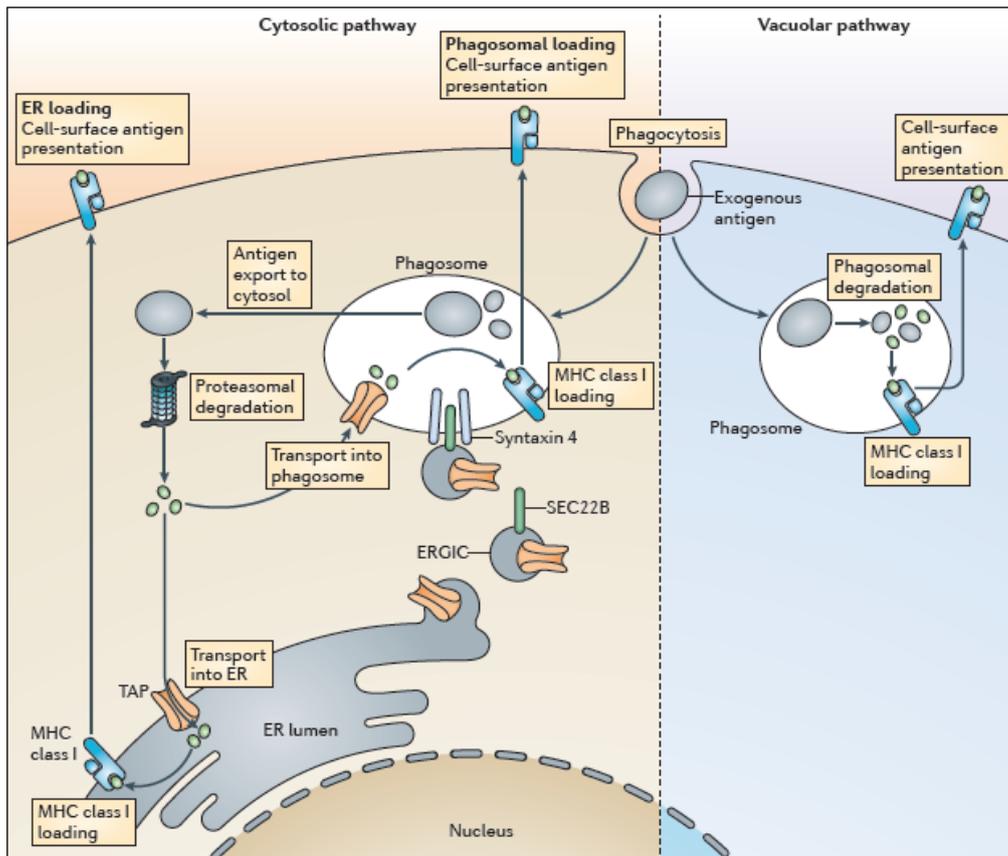


Figura 3. Vías intracelulares para la presentación cruzada en células dendríticas. Luego de la fagocitosis, los antígenos exógenos pueden ingresar al citosol, donde son procesados por el proteasoma. Los antígenos procesados pueden cargarse en moléculas de MHC de clase I en el RE (vía citosólica con carga en el RE) o reimportarse al fagosoma para cargarse en moléculas de MHC de clase I (vía citosólica con carga en fagosomas).

SNARE SEC22B, que se localiza en el compartimiento intermedio RE-Golgi (ERGIC) e interactúa con la sintaxina 4 en los fagosomas, media el reclutamiento a los fagosomas de componentes del RE, incluido el transportador asociado con el procesamiento de antígenos (TAP). Alternativamente, los antígenos exógenos pueden degradarse en péptidos en el fagosoma, donde luego se cargan en moléculas MHC de clase I (la vía vacuolar). *Adaptado de Olivier P. Joffre, Elodie Segura, Ariel Savina & Sebastian Amigorena, 2012.*

Se han reportado principalmente dos vías intracelulares para la presentación cruzada, conocidas como vías “citosólica” y “vacuolar”. La presentación cruzada a través de la vía citosólica es sensible a inhibidores del proteasoma, lo que sugiere que las proteínas internalizadas acceden al citosol, donde son degradadas por el

proteasoma⁹. Aún sigue siendo tema de debate si los antígenos degradados se transportan nuevamente al fagosoma o al RE para un procesamiento adicional y de qué forma son cargados en moléculas de MHC de clase I. Sin embargo, muchos estudios sugieren que los fagosomas juegan un papel importante en la presentación cruzada de antígenos⁹⁰. Por lo tanto, nos referimos a la vía citosólica de presentación cruzada como una vía en la que se produce el procesamiento de antígenos en el citosol, independientemente del sitio de carga del péptido.

Varios grupos han demostrado la presencia en fagosomas o endosomas de proteínas que normalmente residen en el RE⁹¹. En DCs humanas, por ejemplo se observó que ocurría la N-glicosilación de ciertos péptidos luego de la fagocitosis. Dicho proceso es característica del RE, por lo que fue demostrado la comunicación directa entre ambos compartimientos celulares, el RE y el citosol. Se encontraron resultados similares en DCs de ratón⁹.

Cebrián y colaboradores describieron una vía intracelular requerida para la presentación cruzada de antígenos, en la cual el reclutamiento de proteínas del RE al fagosoma depende de la proteína Sec22b. Los autores demuestran que específicamente Sec22b colocaliza con marcadores del compartimiento intermedio (ERGIC, "*RE-intermediate compartment*")⁹¹ y proponen que las proteínas que participan en cargar el MHC-I migran desde el RE al compartimiento ERGIC, para luego retornar al RE o son dirigidas al fagosoma en un mecanismo dependiente de Sec22b⁹¹.

Por el contrario, la presentación cruzada a través de la vía vacuolar es resistente a los inhibidores del proteasoma, pero sensible a inhibidores de la proteólisis lisosomal (en particular, inhibidores de cathepsina S. Esto sugiere que tanto el procesamiento de antígenos, como la asociación a moléculas del MHC clase I ocurren en el compartimiento endocítico⁹. Para proteger los péptidos antigénicos de la degradación por proteasas lisosomales, las BMDCs por ejemplo, mantienen los fagosomas y endosomas/lisosomas a un pH cercano a la neutralidad (pH=7.5)⁹², mientras que los macrófagos y neutrófilos los mantienen a un pH de 4.5 a 7.0 que logra inhibir la activación de las proteasas lisosomales^{87,93}. El pH alto del fagosoma y

del endosoma/lisosoma se atribuye a una reducción de la actividad de la V-ATPasa y al rápido reclutamiento de la NADPH oxidasa NOX2^{9,94,95}. La actividad reducida de la V-ATPasa altera el transporte de protones hacia el lumen, lo que resulta en una acidificación moderada. El aumento de NOX2 produce especies reactivas de oxígeno (ROS), que reaccionan con los protones en el espacio luminal, creando así un ambiente alcalino⁹⁶. Cabe destacar en este punto, y será desarrollado en profundidad más adelante que nuestro grupo demostró que Tmem176b es un canal/transportador iónico, el cual regula el pasaje de cationes en la membrana de fagosomas, lo que impacta directamente en la actividad V-ATPasa y de esa manera en el pH fagosomal⁹⁷.

Savina y colaboradores demostraron el rol que cumple la GTPasa Rac2 en el proceso de presentación cruzada de antígenos en DCs esplénicas que expresan CD8 (CD8⁺). En las DCs CD8⁺, Rac2 determina el ensamblaje a los fagosomas del complejo NADPH oxidasa (NOX2), mientras que en las DCs CD8⁻, Rac1 ensambla NOX2 en la membrana plasmática. En ausencia de Rac2, se reduce el pH fagosomal y por ende la eficiencia de la presentación cruzada de antígenos debido a inhibición de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los fagosomas de DC CD8⁺. Los autores demuestran que Rac 1 y Rac 2 controlan el pH y la oxidación del fagosoma en los diferentes subtipos de DCs, lo que impacta directamente en la eficiencia de la la presentación cruzada de antígenos⁹².

Es importante destacar en el mecanismo de presentación cruzada de antígenos que el procesamiento del antígeno en el compartimiento endofagosómico se produce mediante una cinética rápida. Shanshan y colaboradores proponen que esto ocurre en un tiempo no mayor a 25 minutos post fagocitosis, y demuestran la importancia de la cinética de liberación del antígeno al fagosoma y como afecta directamente esta cinética en la presentación cruzada de antígeno en un modelo de vacuna con levaduras en DCs murinas⁹⁸.

Como será detallado en el próximo apartado, nuestro grupo demostró que las DCs murinas deficientes en Tmem176b (Tmem176b^{-/-}) presentaban menor capacidad de

presentación cruzada de antígenos a las células T CD8⁺. En este trabajo se observó en las DCs Tmem176b^{-/-} que el pH del fagosoma permanecía alcalinizado durante los primeros 30 minutos después de la fagocitosis, lo que podría explicar el defecto de presentación cruzada⁹⁷.

Los antígenos tumorales pueden ser presentados por las DCs en un contexto de MHC clase I (MHC-I) o MHC clase II (MHC-II), permitiendo la activación de linfocitos T CD8⁺ o CD4⁺ respectivamente. Los antígenos presentados en MHC-I son tradicionalmente derivados de proteínas presentes en el citosol, los cuales son procesados por el proteasoma y transportados hacia el retículo endoplásmico mediante el transportador asociado al procesamiento antigénico 1 y 2 (TAP1 y TAP2, *Transporter associated with Antigen Processing*). La activación de linfocitos T CD8⁺ tumor específicos induce su migración al sitio tumoral, donde pueden lisar células tumorales directamente debido a que reconocen péptidos tumorales presentados en MHC-I, proteínas expresadas en todas las células. Esta citotoxicidad involucra la liberación de proteínas citotóxicas principalmente granzimas A, B y C junto con perforinas⁵⁷. Las perforinas polimerizan con la membrana celular formando canales por los cuales las granzimas liberadas ingresan a la célula y activan a las caspasas, induciendo apoptosis⁵⁷. Un mecanismo alternativo de los linfocitos T CD8⁺ para eliminar a las células tumorales, involucra la expresión en membrana de ligandos de receptores de muerte, como el ligando de Fas (FasL) o el ligando de Apo2/TRAIL (Apo2L/TRAIL), los cuales gatillan la activación de caspasas y la apoptosis, cuando se unen a sus receptores⁹⁹.

Como fue mencionado, ciertas subpoblaciones de DCs poseen la capacidad de realizar la presentación cruzada de antígenos, lo que les permite procesarlos y presentarlos en el contexto de MHC-I en vez de MHC-II⁹. Este proceso permite la eficiente activación y diferenciación de linfocitos T CD8⁺ hacia linfocitos T citotóxicos antitumorales⁷³.

Por otra parte, antígenos tumorales internalizados desde el ambiente extracelular serán presentados en el contexto de MHC-II en las DCs, permitiendo la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ que también contribuirán a una eficiente eliminación del tumor.

- ***Contribución de las cDC en el contexto de la respuesta inmune anti tumoral.***

Las DCs desempeñan un papel central en la inmunidad antitumoral, ya que atraen factores solubles, reúnen e intervienen en el “cebado” de células T antitumorales en el TME.

En el contexto de la terapia antitumoral es imprescindible promover la presentación cruzada de antígenos tumorales por parte de las células dendríticas, ya que las células T CD8⁺ son las principales células efectoras en esta respuesta.

Como se mencionó anteriormente, las cDC1 se caracterizan por ser más eficientes en el proceso de presentación cruzada de antígenos, lo que generará una respuesta mayor de células T CD8⁺, así como las cDC1 también polarizan respuesta de células CD4⁺ (Th1)^{73,100,101}. Un estudio reciente demostró en tumores altamente inmunogénicos que para que ocurra el rechazo son esenciales las cDC1 dependientes del factor de transcripción BATF3 (“*Basic leucine zipper transcription factor ATF-like 3*”) ⁷³. También ha sido demostrado que, la administración de vacunas formuladas utilizando cDC1 aumentaron la infiltración de células T CD8⁺ y CD4⁺ en el TME, y disminuyeron la progresión tumoral, incluso en ciertos tipos de tumores que no respondían al tratamiento con anticuerpo anti-PD-1. La terapia combinada de cDC1 cargadas con antígenos tumorales más la terapia con anti-PD-1 generó efectos sinérgicos en un modelo de cáncer que respondía a la inhibición con anti-PD-1 ¹⁰².

Los ganglios linfáticos que drenan al tumor (TDLN) están constituidos por subconjuntos diferentes de cDC1 y cDC2, residentes y migradoras; así como otras DCs migradoras, como pueden ser un subtipo específicos de tejido periférico y las MoDCs ⁶⁵.

Diversos estudios se han realizado en base a esta diferenciación de cDCs, así, se ha demostrado en modelos *ex vivo*, que las cDC1 migradoras fueron el subtipo capaz de generar una activación y consecuente proliferación de células T CD8⁺. Así se le ha atribuido a las cDC1 migradoras, la capacidad de transportar antígenos tumorales a los TDLN, en modelos de melanoma ^{103,104}. Los autores proponen a las cDC1

migradoras CD103⁺ como una subpoblación indispensable para genera inmunidad antitumoral.

Estudios genéticos y funcionales revelan características similares entre las cDC1 de ratón y de humano. La presencia de cDC1 en tumores de melanoma humano se correlacionó con una mejor respuesta a la terapia anti-PD-1, así como con una mayor infiltración de células T CD8⁺ en los tumores, que se asocia con un pronóstico clínico positivo^{77,105}. Ya hemos mencionado anteriormente el rol fundamental de las cDC1 en el desarrollo y mantenimiento de la inmunidad antitumoral en modelos experimentales⁵⁸. Sin embargo, las cDC2 también poseen un rol fundamental en diferentes tipos de cáncer humano ya que son capaces de iniciar respuestas de células TCD4⁺.

Los tumores son infiltrados con frecuencia por cDC2, las cuales migran al TDLN para iniciar las respuestas. Recientemente Binnewies y colaboradores, demostraron una correlación positiva entre la abundancia de las cDC2 y la infiltración de células TCD4⁺. Los autores utilizaron un modelo de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, en el cual se correlacionó una sobrevida aumentada cuando existía infiltración de cDC2. Las células Treg restringen las respuestas antitumorales vía cDC2, ya que inhiben la maduración de las DCs e impiden la migración de estas al TDLN. Los autores mostraron que pacientes con melanoma que tenían un bajo número de células Treg respondían mejor a la terapia con anti-PD1, mostrando una mayor densidad de cDC2 intratumorales⁷⁷.

La eliminación de la supresión por parte de las Treg permite que las células T CD4⁺ productoras de IFN- γ se acumulen en el TME, lo que sugiere que las respuestas de IFN- γ pueden proporcionar un efecto antitumoral dominante^{106,107}.

Curiosamente, en un estudio comparativo entre células mieloides de humanos y ratones, se observó en humanos una correlación positiva entre la firma genética del subtipo cDC2 con un pronóstico clínico positivo en adenocarcinoma de pulmón¹⁰⁵.

- *Eje: cDC2 – Th17 – respuesta anti tumoral.*

Como ya mencionamos anteriormente, algunas cDC2 promueven respuestas inmunes en las que se activan las células Th2 e ILC2¹⁰⁸. En cambio otras cDC2 inician respuestas inmunes que generan activación de células Th17 e ILC3⁷⁸.

El rol de las células Th17 en el cáncer es controvertido debido a su amplia diversidad y a la plasticidad de las células productoras de IL-17 en el TME y a la vía de diferenciación que la genera. Las células Th17 pueden diferenciarse a partir de células T CD4⁺ *naïve* en presencia de TGF- β , IL-6, IL-1 β o IL-21. La IL-23 es fundamental para la diferenciación terminal y el mantenimiento de las células Th17. Cuando la diferenciación a Th17 ocurre en presencia de IL-6, IL-1 β e IL-23, y en ausencia de TGF- β , se generan células Th17 con potentes funciones efectoras¹⁰⁹. Las células Th17 se caracterizan por su capacidad de secretar IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 y CCL20. También expresan el factor de transcripción ROR γ t^{110–114}.

Han sido reportados estudios que muestran un efecto anti-tumoral de las células Th17, así como otros que muestran su participación en la progresión tumoral. Se ha detectado una alta frecuencia de células Th17 en el infiltrado tumoral de pacientes con carcinoma hepatocelular, colorrectal y carcinoma pancreático; y se asocia con un mal pronóstico. Por el contrario, la infiltración de células Th17 mejoró notablemente la supervivencia de pacientes con carcinoma de ovario¹¹⁵. Por el contrario, no se observaron cambios en la supervivencia en pacientes con cáncer nasofaríngeo, con respecto a la presencia de Th17 intratumorales¹¹⁴. Estos resultados contradictorios también se encontraron en modelos de tumores en ratones (experimentos de transferencia adoptiva). La causa de estos resultados discutibles podría deberse a la plasticidad de las células Th17 y el TME que se genera en cada tipo de cáncer. Es importante destacar que, las células Th17 diferenciadas en presencia de TGF- β producen IL-10, reforzando su poder inmunoregulador. En cambio, las células Th17 diferenciadas en presencia de IL-1 β , IL-6 e IL-23 no expresan CD39 y CD73. La expresión de CD39 y CD73 lleva a la transformación de ATP o ADP a adenosina, la cual tiene potente efecto inmunosupresor. Estas células co-expresan los factores de

transcripción Tbet y ROR γ t, lo que resulta en la secreción de IFN- γ e IL-17, pero no IL-10. Estas células Th17, “tipo Th1”, median la regresión tumoral observada en algunos diseños experimentales ^{111,115,116}. Las células Th17 también pueden diferenciarse en Treg que expresan FOXP3 y mostrar una función inmunosupresora eficaz ¹¹⁷.

Estudios en pacientes con melanoma con alta frecuencia de células Th17 mostraron un aumento de la supervivencia del paciente ¹¹⁸.

Se sugiere que las células Th17 median una función citotóxica contra las células tumorales, al inducir el reclutamiento de otras células efectoras, así promoviendo la actividad antitumoral de manera indirecta. Por ejemplo, aumentan la migración de células T efectoras, como linfocitos T citotóxicos CD8⁺, células NK, y aumentan la función de estas últimas. Además provoca el aumento de citoquinas como IL-6, que finalmente activarán los linfocitos T citotóxicos. Las células Th17 pueden promover la producción de la quimioquina CCL20 por el tejido tumoral, y de esta forma reclutar células T CD8⁺ al tumor. Por último, las Th17 también activan macrófagos para que produzcan IL-12. Esto aumenta la actividad citotóxica del macrófago. Y aumentan la infiltración de neutrófilos al microambiente tumoral ^{114,119}.

En el siguiente apartado intentaré describir las vías de activación del inflamasoma NLRP3, el cual, como mencionado anteriormente, es nuestro foco de estudio en esta tesis y en nuestro grupo de trabajo. Primero describiré a Tmem176b como un regulador iónico del inflamasoma NLRP3.

- *Tmem176b como un regulador iónico del inflamasoma NLRP3*

Nuestro grupo mostró por primera vez que Tmem176b es un canal iónico con propiedades inmunoregulatorias el cual modula el contenido iónico del citosol⁹⁷. Con esa base el foco del trabajo ha sido caracterizar de un punto de vista biológico en profundidad a esta proteína intracelular Tmem176b en diferentes escenarios

fisiopatológicos. Así demostramos recientemente que Tmem176b se posiciona como un potencial regulador iónico del inflamasoma NLRP3 en un modelo tumoral ¹²⁰. TMEM176B ó TORID (“*tolerance-related and induced*”) y su homólogo TMEM176A forman parte de la familia de proteínas MS4A (“*membrane-spanning 4-domain family, subfamily A*”) ^{121,122,123}.

TMEM176B posee expresión ubicua en humanos, encontrándose en órganos como pulmón, riñón, ganglios linfáticos y bazo. Con respecto a la expresión en células del sistema inmune, TMEM176B se expresa en: cDCs y plasmocitoides, granulocitos, monocitos, células ROR γ t⁺ como son las células Th17 e ILC3 ^{121,124}.

TMEM176B se localiza en la membrana endofagosomal, así como en la red trans-Golgi ^{97,124}. Su expresión se ha asociado al estado inmaduro de monocitos y DCs, la cual disminuye luego de un estímulo inflamatorio ¹²¹.

Louvet y colaboradores reportaron en experimentos de transcriptómica un aumento en la expresión de Tmem176b en corazones aloinjertados tolerados en comparación con los rechazados o los injertos singénicos¹²². Un estudio llevado a cabo por Anandasabapathy y colaboradores demostró que TMEM176B se encuentra sobreexpresada en DCs migradoras que inhiben la respuesta inmune a vacunas ¹²⁵ y además también fue encontrado sobreexpresado en células dendríticas involucradas en la diferenciación de las células Th2 ¹²⁶.

Villani y colaboradores demostraron un aumento en la expresión de Tmem176b en DC humanas de tipo 2 (CD1c⁺) utilizando técnicas de secuenciación de RNA (scRNAseq) previo a una separación por citometría de flujo (FACS). Este aumento de expresión fue observado en un subtipo de CD1c⁺ que expresa una firma única de genes de inflamación aguda y crónica, el cual los autores denomina como DC3⁸⁰.

Además otro estudio en muestras de sangre humana realizó scRNAseq con un previo análisis de citometría de flujo de alta dimensión, demostró la expresión de Tmem176b en un subtipo de DCs que los autores también denominaron “DC3”, parcialmente similar al DC3 identificado por Villani y colaboradores, pero en el cual se incluyeron marcadores como el CD14 para su discriminación. Así la población de “DC3” es CD33⁺CD88⁻CD1c⁺CD163⁺ y también expresaba marcadores monocíticos como CD14, S100A8, S100A9, S100A12, y VCAN⁸².

También Brown y colaboradores demostraron en modelos murinos, que Tmem176A y Tmem176b está altamente expresado en un subtipo de cDC2 que ellos diferencian por ser Tbet⁺cDC2, el cual posee un perfil pro-inflamatorio⁸¹.

Nuestro grupo ha reportado que TMEM176B es un canal iónico inmunomodulador y en BMDCs controla el pH fagosomal y promueve la presentación cruzada para activar linfocitos Treg CD8⁺, mecanismo asociado con la tolerancia a los aloinjertos⁹⁷.

Para mostrar que TMEM176B se requiere para que ocurra la presentación cruzada de antígenos, en este trabajo Segovia y colaboradores, realizaron ensayos de presentación cruzada *in vitro*. Para esto se trataron células ATDCs (DCs tolerogénicas autólogas, derivadas del receptor) con diferentes estímulos como la proteína soluble OVA ó beads recubiertas con OVA, y luego fueron cultivadas con células T CD8⁺ derivadas de ratones OT-I (ratones que expresan el TCR transgénico OT-I (V α 2.1V β 5.1) que reconoce el péptido SIINFEKL (derivado de OVA) enmarcado en una molécula de MHC de clase I H2-kb). LAS ATDCs provenían de animales que expresaban o no la proteína Tmem176b. El aumento de proliferación de estas células, medida a través de una sonda fluorescente (DDAO), refleja una mayor presentación cruzada de antígenos. Se observaron en estos experimentos que las ATDCs derivadas de animales Tmem176b^{-/-} fueron menos efectivas en realizar la presentación cruzada de antígenos. Es importante destacar que se utilizó el péptido mínimo derivado de la proteína OVA, SIINFEKL para estimular ambos tipos de ATDCs y no se observó una diferencia en la exposición de este péptido a células T CD8⁺. O sea que la diferencia observada entre ambos tipos de ATDCs no es debida a la presentación del péptido en sí en la molécula de MHC, sino que la diferencia ocurre durante el procesamiento del péptido en el proceso de presentación cruzada del antígeno. Los autores concluyeron que Tmem176b es necesario para realizar la presentación cruzada de antígenos solubles y particulados de la proteína OVA por las ATDCs. También se utilizó la expresión de OVA endógena, a través de la electroporación de las ATDCs con OVA mRNA, y en estos experimentos no se observó diferencias entre las ATDCs derivadas de animales WT ó Tmem176b^{-/-}, indicando que Tmem176b no está involucrado en la vía endógena de presentación de antígenos⁹⁷. En este trabajo también fue descrito que el pH fagosomal de las ATDCs derivadas de animales WT lograron mantener un

pH cercano a la neutralidad aún luego de 120 minutos post fagocitosis; mientras que las ATDCs derivadas de animales *Tmem176b*^{-/-} poseen un pH más básico. Estudios en oocitos de *Xenopus* en complemento de estudios en BMDCs demostraron que *Tmem176b* es un canal/transportador iónico, que en la membrana de fagosomas regula el pasaje de cationes lo que impacta directamente en la actividad V-ATPasa y de esa manera en el pH fagosomal⁹⁷. En ese trabajo, nuestro equipo demostró también de forma directa que las Treg CD8⁺CD11c⁺ inhiben el rechazo del trasplante,⁹⁷.

Diversos estudios sugieren la participación de TMEM176B en la modulación de la presentación cruzada de antígenos en humanos. Por ejemplo, en modelos *in vivo*, la inyección de DCs se asoció con la inhibición de la función de las células T efectoras, de una forma específica de antígeno, y también con la inducción de células Treg CD8⁺ específicas de antígeno^{127,128}.

Las DCs humanas que son capaces de realizar la presentación cruzada de antígenos, como las DCs BDCA3⁺ sanguíneas, las DCs BDCA1⁺ residentes de amígdalas, las DCs BDCA3⁺ y las pDC, descritas por Segura y colaboradores como DCs inflamatorias presentan una firma genética similar a las DCs derivadas de monocitos, por lo tanto podemos inferir que expresarían TMEM176B¹²⁹.

Diferentes estudios han mostrado que la expresión de canales iónicos, como TMEM176B, esta alterada en varios tipos de cáncer en comparación con tejidos normales. En cáncer gástrico bajos niveles de ARNm de TMEM176A y TMEM176B han sido correlacionados con mejor supervivencia¹³⁰. Cuajungco y col. mostraron que la expresión de TMEM176A, así como de TMEM176B se encuentra elevada en linfomas, pero no en tejidos normales, y que TMEM176A por si solo esta incrementado en carcinoma de pulmón¹³¹. Del mismo modo, fue descrito que TMEM176B está sobre expresado en carcinoma renal, específicamente en células que forman parte de la neovascularización de este tumor, sugiriendo así un rol en la angiogenesis¹³².

- **Inflamasoma NLRP3**

Los inflamasomas son plataformas multiproteicas citosólicas que se ensamblan en respuesta a patrones moleculares asociados a patógenos invasores (PAMPs) ó a daño (DAMPs), producen la maduración de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β e IL-18 y desencadenan las defensas inmunes innatas para eliminar a microorganismos patogénicos ¹³³. Estos complejos multiméricos están compuestos por una proteína sensora que pertenece al receptor AIM2 (*“absent in melanoma-2”*) ó a NLR (*“nucleotide-binding domain leucine-rich repeat*), la proteína adaptadora ASC (*“adaptor molecule apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD”*) y un zimógeno inactivo, la Pro-Caspasa-1 ¹³⁴.

La familia de proteínas del receptor NLR (NLRP) es un grupo de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) conocidos por mediar la respuesta inmune innata inicial a la lesión celular y el estrés. La familia NLRP consta de 14 miembros distintos y es la subfamilia de NLR mejor caracterizada. Ciertas proteínas NLR (NLRP3, NLRP1, NLRC4) están funcionalmente relacionadas en su capacidad para formar inflamasomas. Las proteínas no NLR como son AIM2, IFI16 y Pyrin también forman inflamasomas. Otros tipos de inflamasomas, incluidos los inflamasomas NLRP6 y NLRP7 siguen siendo controvertidos ¹³⁵.

Los primeros estudios científicos sobre los NLR suponían que todas las proteínas NLRP solo activaban inflamasomas vía Caspasa-1. Esto se conoció como su "función canónica". A pesar de esta suposición, no se ha demostrado bioquímicamente que ciertos NLRP formen inflamasomas y activen Caspasa-1 (por ejemplo, NLRP12). Entonces, los NLRP actualmente se subdividen en dos categorías: 1) los NLRP canónicos, que actúan a través de la formación de inflamasomas activadores de Caspasa-1; y 2) los NLRP no canónicos, que funcionan a través de mecanismos independientes del inflamasoma o caspasas alternativas. Algunos NLRP, como NLRP3, tienen funciones canónicas y no canónicas, según el estímulo y el tipo de tejido en cuestión ¹³⁵.

Entre los diferentes inflamomas identificados hasta ahora, NLRP3 es de gran interés ya que las mutaciones en el gen *NLRP3* están asociadas con enfermedades autoinflamatorias como el síndrome de Muckle-Wells, la enfermedad inflamatoria multisistémica de inicio neonatal y la urticaria por frío familiar (síndrome autoinflamatorio). Por otro lado, mientras que otros inflamomas son principalmente detectores de motivos moleculares específicos, NLRP3 actúa como un sensor general de perturbaciones celulares que incluyen flujo de potasio, daño lisosómico y producción de ROS. Además de este papel central de NLRP3 en la inflamación, publicaciones recientes muestran que el inflamoma NLRP3 también está involucrado en la fisiopatología de varios trastornos neurológicos, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis múltiple ¹³⁶. Existen evidencias claras de un rol de proteínas relacionadas al inflamoma en enfermedades humanas, abarcando desde enfermedades inflamatorias monogénicas hasta desórdenes inmunes y metabólicos más comunes¹³⁷.

Por lo descrito anteriormente y por ser el más estudiado, me centraré en el NLRP3 a continuación en esta tesis de trabajo.

El ensamblado del inflamoma NLRP3 (ver Figura 4) da como resultado el procesamiento de la procaspasa-1 inactiva en una cisteína-proteasa activa, caspasa-1, que posteriormente activa las citoquinas proinflamatorias, la IL-1 β y la IL-18. La activación del inflamoma también induce piroptosis, una forma de muerte celular inflamatoria ¹³⁴.

Hay dos señales clave que permiten la activación del inflamoma NLRP3, una primera señal de cebado y una segunda señal de activación ó ensamblado. La señal de cebado, ocurre a través de la estimulación de PRR vía PAMPs y/o DAMPs y la subsecuente señalización a través de NF- κ B. Esto aumenta la expresión de NLRP3 inactiva y de pro-IL-1 β , aunque no está claro si la inducción de la expresión de NLRP3 es necesaria o no para la posterior activación del inflamoma. El cebado también tiene una segunda consecuencia: la desubiquitinación de NLRP3 por BRCC3, que es también un requisito para la activación del inflamoma NLRP3 y la fosforilación de ASC. No está totalmente descrito el mecanismo a través del cual la desubiquitinación contribuye a la activación del inflamoma NLRP3.

La segunda señal de activación o ensamblado conduce a la formación final del inflamasoma NLRP3 mediante la oligomerización de NLRP3 inactivo, ASC y Pro-caspasa-1, formando el complejo final con NLRP3, ASC y Pro-caspasa-1. La oligomerización de Pro-Caspasa-1 induce su clivaje autoproteolítico a la forma activa de la Caspasa-1. La Caspasa-1 activa es una proteasa dependiente de cisteína que cliva los precursores de las citoquinas Pro-IL-1 β y Pro-IL-18, generando la forma biológicamente activa de estas citoquinas¹³⁸.

Con respecto a la segunda señal en el proceso de activación, sabemos que hay una gran cantidad de PAMPs y DAMPs que activan el inflamasoma NLRP3, incluidos ATP, ácido úrico, nigericina, aluminio, asbesto, agregados amiloides, así como una gama de toxinas microbianas, incluida la toxina de *Clostridium difficile* y las toxinas Shiga derivada de *Escherichia coli*. Ninguno de estos estímulos se une y activa directamente NLRP3. En cambio, estos estímulos involucran una serie de vías comunes que finalmente culminan en la activación del inflamasoma NLRP3. Estas vías incluyen el eflujo de potasio de la célula, la ruptura lisosómica, la movilización de calcio, la producción de ROS, la translocación de NLRP3 a las mitocondrias y la liberación de DAMPs mitocondriales, como el ADN mitocondrial y la cardiolipina. También se ha reportado que un eflujo de cloro puede activar al inflamasoma¹³⁹.

Estudios recientes sugieren que el eflujo de potasio es el punto de convergencia para todas estas vías, ya que el bloqueo del eflujo de potasio inhibe la activación del inflamasoma “downstream” (aguas abajo) de todas las vías mencionadas anteriormente y un nivel bajo de potasio es suficiente para desencadenar la activación del inflamasoma NLRP3. En este modelo, NLRP3 sirve como sensor general de alteraciones en la homeostasis celular, y así desencadena un potente impulso pro inflamatorio para recuperar la homeostasis o desencadenar la muerte en la célula afectada¹³⁵.

Por otro lado, podemos mencionar a los reguladores negativos del inflamasoma NLRP3 que incluyen sustancias con una estructura similar a los dominios PYD o CARD, autofagia, citoquinas, NO, CO y miRNA. La existencia de un equilibrio entre la activación y la inactivación del inflamasoma NLRP3 es crítico para mantener la homeostasis normal y la función fisiológica¹³⁸.

Como se mencionó anteriormente, la activación de NLRP3 incluye múltiples señales, la mayoría de las cuales no son mutuamente excluyentes, incluido el eflujo de Potasio (K^+) e iones Cloruro (Cl^-), flujo de iones de Calcio (Ca^{++}), disrupción lisosómica, disfunción mitocondrial, cambios metabólicos y desensamblado *trans*-Golgi. Dichas señales están interrelacionadas y se superponen. Hasta el momento, no existe un único modelo de activación de NLRP3.

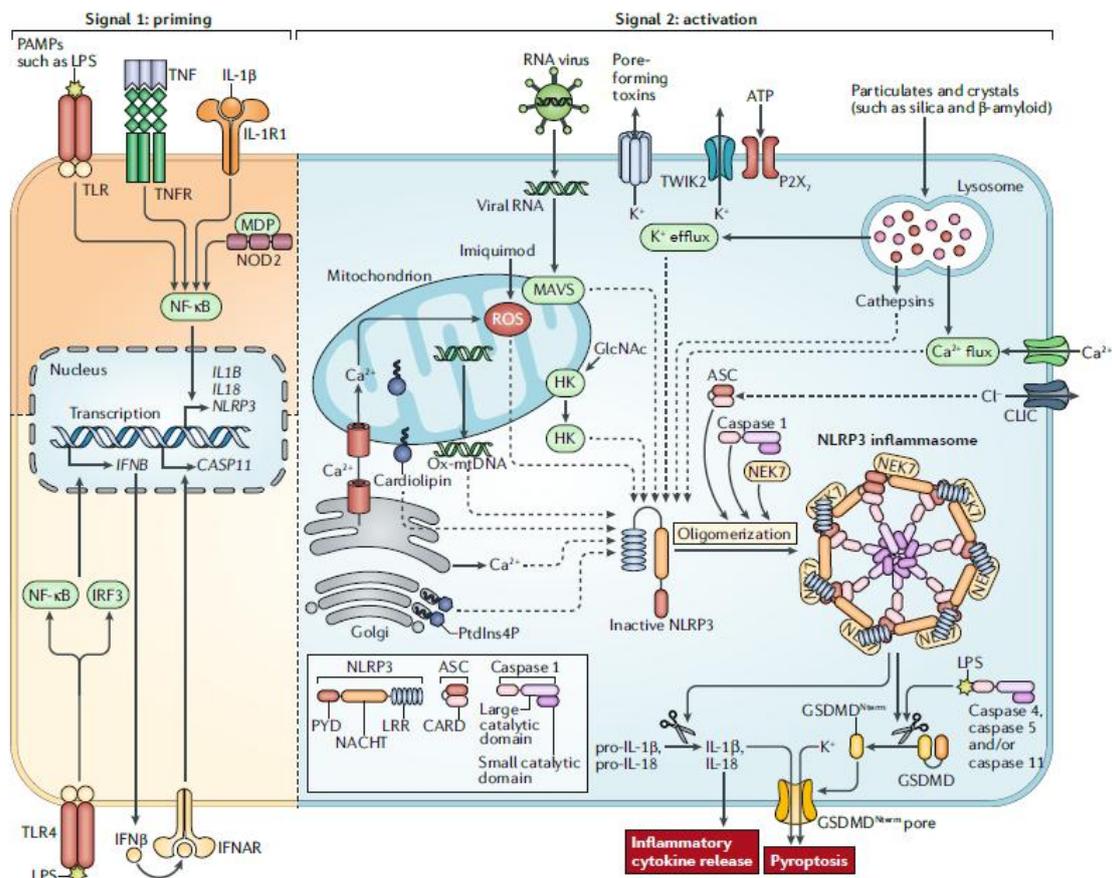


Figura 4. Mecanismo de activación del inflammasoma NLRP3. La señal 1 (“priming” ó cebado) es proporcionada por componentes microbianos o citoquinas endógenas que conducen a la activación del NF-κB y consecuentemente la regulación positiva de NLRP3 y pro-interleuquina-1 (pro-IL-1β). La señal 2 (“activation” ó activación) es proporcionada por una variedad de estímulos que incluyen ATP extracelular, toxinas formadoras de poros, virus de ARN, cristales y partículas. Múltiples eventos moleculares o celulares, incluidos el flujo iónico (Cl⁻, K⁺ y Ca⁺⁺), la disfunción mitocondrial y la generación de especies reactivas de oxígeno mitocondriales (mtROS) y el daño lisosómico, activan el inflammasoma NLRP3. La formación del inflammasoma activa la caspasa 1, que a su vez escinde pro-IL-1β y pro-IL-18. La Caspasa-1 cliva a gasdermin D (GSDMD), obteniendo como resultado la formación de e induciendo piroptosis. Tomado de Swanson et al, 2019.

El estudio de la relación entre el sistema inmune y el cáncer, y los mecanismos de evasión al sistema inmune utilizado por los tumores, han permitido el desarrollo de una variedad de terapias contra el cáncer que utilizan al sistema inmune del hospedero para generar respuestas contra las células tumorales. Estas terapias, denominadas inmunoterapias, las cuáles son el foco de estudio de esta tesis y de nuestro grupo de investigación, serán desarrolladas a continuación.

- *Inmunoterapia contra el cáncer*

- *Generalidades*

Las evidencias que apoyan la teoría de la inmuoedición y el ciclo de la inmunidad antitumoral impulsaron a que la terapia en cáncer se enfocara a la actividad antitumoral del sistema inmune^{22,140}. La **inmunoterapia** es una estrategia terapéutica que aprovecha el sistema inmune del hospedero para generar una respuesta contra las células tumorales. En este sentido, busca una respuesta duradera intentando prevenir recaídas o la aparición de metástasis, llegando a obtener resultados en términos de sobrevida libre de enfermedad y sobrevida global que no se habían logrado con estrategias como la radio y quimioterapia.

Dentro de la categoría inmunoterapia pasiva están los anticuerpos monoclonales (mAb: "*monoclonal antibody*") dirigidos a antígenos específicos del tumor y la transferencia adoptiva de células ACT ("*Adoptive Cell Therapy*"), los cuáles poseen por sí mismo actividad anti tumoral¹⁴¹. En la actualidad, los mAb son el tipo de inmunoterapia más empleada y la mejor caracterizada. Podemos mencionar diferentes tipos de mAb ampliamente utilizados,^{141,142} como anticuerpos dirigidos frente a receptores de vías de señalización¹⁴³, anticuerpos que reconocen y neutralizan factores tróficos, anticuerpos que inducen la muerte de las células

tumorales directamente o a través de otros mecanismos que implican al sistema inmune (por ejemplo, vía del complemento, fagocitosis o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)^{144,145}, etc. En cambio, la ACT se basa en la transferencia de células citotóxicas que se han manipulado *ex vivo* para modificarlas, activarlas o expandirlas. Según el origen de las células transferidas se habla de una inmunoterapia celular autóloga o alogénica. Se han observado excelentes resultados clínicos con la transferencia de células T autólogas modificadas por ingeniería genética para expresar un receptor antigénico quimérico específico (células CAR T)¹⁴⁶. Por el contrario, ejemplos de inmunoterapia activa son las vacunas y los bloqueadores de punto de control (BPC) que requieren la activación del sistema inmune del hospedero para su actividad.

La inmunoterapia ha marcado una revolución en la terapia contra el cáncer porque ha logrado efectos que nunca antes se habían conseguido con las terapias clásicas. Estas terapias han demostrado inducir la regresión tumoral completa y duradera en algunos tipos de cáncer, convirtiéndose un verdadero hito en las terapias dirigidas, sin embargo presentan desafíos como comprender los mecanismos de resistencia y los eventos adversos inmuno relacionados. Describiré los BPC, que son fármacos actualmente aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) para su administración en diferentes tipos de cáncer, y es en esta área que nuestro grupo de trabajo ha publicado recientemente el beneficio del uso de los BPC combinados con la administración de BayK8644.

- ***Bloqueadores de Puntos de Control Inmune (BPC)***

Los puntos de control inmunológicos son de extrema importancia al mantener las respuestas inmunes dentro de un rango fisiológico deseado y protegen al hospedero de desarrollar autoinmunidad, sin embargo, son utilizados por los tumores a su favor, suprimiendo de esta forma la respuesta inmune. En condiciones normales, los puntos de control inmunológicos juegan un papel crucial en la prevención de la

autoinmunidad y también en la protección de tejidos cuando el sistema inmune está respondiendo a una infección patogénica. La regulación de estos puntos de control inmunológicos puede ser inducida por tumores, y permitir así una evasión de la respuesta inmune. Los dos receptores de los puntos de control inmune más estudiados en el contexto clínico de la inmunoterapia del cáncer, son el receptor del antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4), y el receptor de la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1), que son puntos de control del sistema inmune que regulan de forma negativa la función de las células T ¹⁴⁷. Los bloqueadores de puntos de control inmune eliminan señales inhibitorias para la activación de células T, lo que permite a las células T específicas del tumor superar los mecanismos reguladores y desencadenar una respuesta anti tumoral efectiva.

El receptor CTLA-4 (CD152) se expresa luego de que las células T CD4⁺ y CD8⁺ se activan y tiene un rol importante en la tolerancia de las células T. También es expresado por células Treg FoxP3⁺ y modula su función supresora ^{148,149}. CTLA-4 y su homólogo estructural, el receptor coestimulador CD28, comparten los mismos ligandos B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), los cuales son expresados por APCs entre otras células ¹⁵⁰. CTLA-4 inhibe las funciones de las células T por diferentes vías: se une a su ligando con una mayor afinidad que su contraparte CD28, inhibe la señalización por el TCR al reclutar fosfatasa en su dominio intracelular, disminuye la expresión del ligando B7 en las APCs e induce la secreción de la enzima IDO ^{148,149,151,152}.

La función principal de CTLA-4 es regular la actividad de células T en el sitio de “cebado”, por ejemplo en órganos linfoides secundarios. Sin embargo, CTLA-4 también puede atenuar la activación de células T en tejidos periféricos dado que los ligandos B7 también pueden ser expresados por células T activadas ¹⁴⁷. El bloqueo de la vía CTLA-4 surgió como una estrategia para el tratamiento del cáncer; en ensayos clínicos para Ipilimumab un mAb completamente humanizado que bloquea CTLA-4, las tasas de respuesta promediaron entre el 10 y el 15% entre los pacientes con melanoma avanzado ^{148,153,154}. El Ipilimumab fue el primer inhibidor de puntos de control inmunológico en obtener la aprobación de la FDA para el tratamiento del melanoma metastásico en 2011. Además, el beneficio terapéutico del bloqueo de CTLA-4 también puede resultar de la reducción de Tregs a través de la ADCC ^{149,155}.

Otro punto de control inmunológico es la molécula PD-1 (CD279). PD-1 se expresa en células T, NK, NKT, células B, macrófagos y algunas subpoblaciones de DCs durante la activación inmune e inflamación crónica. Funciona como un importante regulador negativo de la inmunidad generada por las células T, y es crítico en el proceso de tolerancia en los tejidos periféricos y la homeostasis inmune ¹⁵⁶. PD-1 tiene dos ligandos conocidos, PD-L1 (CD274) y PD-L2 (CD273) ¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. PD-L1 se expresa ampliamente en células hematopoyéticas y no hematopoyéticas, incluidas APC, células epiteliales, estromales y tumorales, y la expresión es estimulada por citoquinas proinflamatorias como IFN- γ , TNF- α y también por el factor VEGF. La expresión de PD-L2, por otro lado, se restringe principalmente a las DCs, macrófagos y células B, y es inducida por citoquinas como IL-4 y GM-CSF ^{149,160}. Debido a que los ligandos de PD-1 se expresan ampliamente en tejidos no linfoides, se cree que PD-1 actúa principalmente regulando la activación de la célula T en periferia ¹⁴⁷. Luego de la unión a sus ligandos, PD-1 transmite una señal co-inhibitoria a través de la tirosina fosfatasa SHP2, atenuando la activación de la célula T. El reclutamiento de SHP2 atenúa directamente la señalización del TCR al desfosforilar elementos de señalización proximales ^{147,156,161,162}. Además, el receptor PD-1 activado secuestra mediadores de señalización del TCR ¹⁶³, induce la expresión de factores proapoptóticos y altera la motilidad y el metabolismo de las células T ¹⁴⁹. PD-1 también se expresa en células Tregs, y la participación de PD-L1 promueve la diferenciación, el mantenimiento y la función supresora de Tregs, lo que induce aún más la tolerancia de las células T ¹⁶⁴. Las células B también expresan PD-1, y la señalización de PD-1 modula la inmunidad humoral al inhibir la expansión de las células B, la diferenciación de las células plasmáticas y las funciones efectoras de las células B ¹⁵⁶.

Finalmente me gustaría hacer referencia a los mecanismos a través de los cuales el bloqueo de PD-1 desencadena la inmunidad anti tumoral. La vía de PD-1 altera la activación de las células T y atenúa las funciones efectoras y la proliferación de las

células T, lo que promueve la aparición de las células T exhaustas, las cuales describí en el apartado anterior “generalidades”^{149,165}. El exhausting de las células T es un mecanismo importante que limita la actividad de las mismas en presencia de estimulación antigénica crónica y actúa para preservar clones de linfocitos T que de otra manera sufrirían una muerte celular inducida por activación¹⁴⁷.

La terapia con anticuerpo anti-PD-1 puede mejorar la inmunidad antitumoral al prevenir el agotamiento (“*exhausting*”) de las células T CD8⁺, al promover el cebado de las células T *de novo* y/o al modular las células que ya poseen un fenotipo de exhausta, ver Figura 5, tomada de la revisión publicada recientemente por nuestro grupo¹⁶⁶.

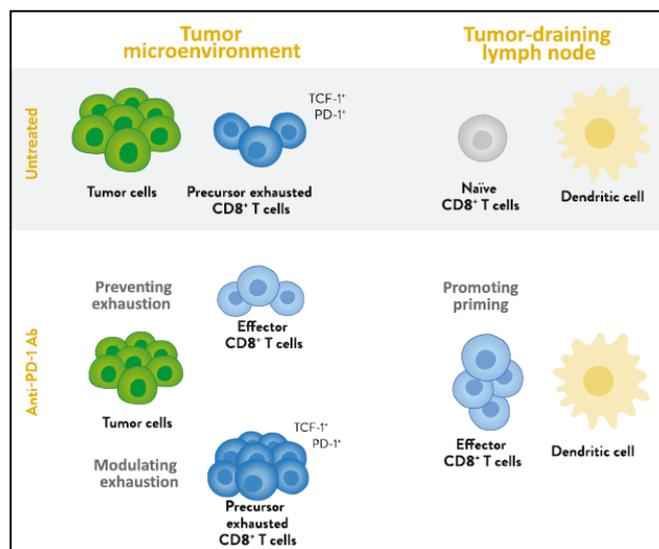


Figura 5. Mecanismos subyacentes a la inmunidad antitumoral, desencadenados por la terapia con BPC, como por ejemplo, el anticuerpo anti-PD1. Para ciertos tipos de cáncer, el tratamiento con anticuerpos anti-PD-1 puede prevenir el mecanismo de exhausting de las células T CD8⁺ efectoras, modular el exhausting de las células T CD8⁺ progenitoras exhaustas en el TME, así como promover el cebado de células T efectoras CD8⁺ en TDLN, en humanos y ratones. Prevenir o modular el exhausting así como promover el cebado de células T CD8⁺ son mecanismos no excluyentes. Tomado de Hill *et al*, 2020.

Para entender los mecanismos que subyacen a la terapia con BPC, es importante destacar la existencia de diferentes subtipo de linfocitos T CD8⁺ exhaustos, que

poseen diferentes funciones y que son modulados diferencialmente por la terapia con anticuerpo anti-PD-1/PD-L1. Se le adjudica la función de promover la respuesta anti tumoral en el contexto de terapia con BPC, a un subtipo de células T exhaustas indiferenciadas, llamadas “Células T exhaustas Progenitoras”, que expresan los siguientes marcadores: CD8⁺ PD-1⁺ TCF-1⁺ TIM3⁻ GZMB⁻ CX3CR1⁻ TOX⁺. En el TME, este subconjunto puede autorrenovarse para generar “células T CD8⁺ exhaustas terminalmente diferenciadas”, que muestran un fenotipo CD8⁺ PD-1⁺ TCF-1⁻ TIM3⁺ GZMB⁺ CX3CR1⁻ TOX⁺ ¹⁶⁶.

Durante la terapia con BPC, los linfocitos T progenitores exhaustos (PD-1⁺ TCF1⁺ TIM3^{lo}) proliferan y se diferencian en linfocitos T terminalmente exhaustos (PD-1⁺ TCF1⁻ TIM3^{hi}) que pueden conducir al control del tumor. Las células PD-1⁺ TCF1⁺ residentes en el tumor formarían un nicho de células T CD8⁺ específicas del tumor que proliferan y pueden generar células diferenciadas en respuesta al bloqueo de PD-1. Se propone que este mecanismo funcione como un eje inmune complementario que opera independientemente del ciclo cáncer-sistema inmune descrito anteriormente¹⁶⁶.

Teniendo en cuenta lo mencionado en el apartado anterior sobre el Ciclo Cáncer- Inmunidad, y la acción descrita de CTLA-4 y PD-1, se ha observado que los anticuerpos anti-CTLA-4 y anti-PD1 ejercen su función en diferentes etapas del ciclo. En los sitios de “cebado” actuaría el bloqueo de CTLA-4, que es donde participa la co-estimulación positiva por CD28, sin embargo el bloqueo de PD-1 actuaría en tejidos periféricos inflamados ²⁶. No obstante, resultados publicados recientemente sugieren que los mecanismos de acción del bloqueo de CTLA-4 y PD-1 no se encuentran limitados únicamente a estos sitios. Se ha reportado que se requiere de co-estimulación por CD28 para que el bloqueo de PD-1 logre rescatar células T CD8⁺ exhaustas ¹⁶⁷. Por lo tanto, puede que el bloqueo de PD-1 actúe en tejidos periféricos así como en sitios de “cebado”.

El sistema inmunológico es muy dinámico y no solo reconoce una amplia gama de antígenos tumorales en poblaciones de células tumorales heterogéneas, sino que también se adapta para atacar nuevos antígenos a medida que las células tumorales

adquieren mutaciones. Esta plasticidad de las respuestas inmunes endógenas puede explicar por qué el bloqueo de los puntos de control inmunológico destinado a reactivar la inmunidad de células T endógenas preexistentes logra respuestas duraderas.

Como fue mencionado anteriormente, el tratamiento con BPC ha revolucionado el tratamiento del cáncer. Sin embargo, por razones todavía no comprendidas, solo una pequeña parte de los pacientes tratados logran obtener beneficio clínico. Una de las estrategias propuestas para lograr vencer mecanismos de resistencia primaria y secundaria es la inmunoterapia basada en Nanomedicina. A continuación me focalizaré en el uso de nanopartículas en Biomedicina. En mi tesis de doctorado utilizamos las nanopartículas de quitosano como medio de encapsulación del compuesto BayK8644 y estudiamos su efecto como agentes inmunoterapéuticos.

- *Nanopartículas en Biomedicina: Nanoterapia*

La nanotecnología es el estudio, diseño, creación, manipulación y tratamiento de átomos, moléculas o compuestos individuales para producir nanomateriales y nanodispositivos con aplicaciones especiales en diversos campos de estudio. El término nanopartícula (NP) hace referencia a distintos nanomateriales tanto inorgánicos como orgánicos o incluso una mezcla de ambos, cuyas unidades estructurales tienen dimensiones lineales que oscilan entre 1-100 nm^{168,169}. Las propiedades de estas NP vienen determinadas por muchos factores, como composición química del núcleo (distinguiendo las NPs de naturaleza orgánica (liposomas, polímeros) o inorgánica, forma (esferas, prismas, etc), tamaño (entre 1 y 100 nm), medio de dispersión (pueden ser estables en fase orgánica o acuosa, según el método de síntesis y tratamientos posteriores), estado de dispersión (dispersas,

aglomeradas o agregadas) y ligandos en la superficie (estabilizantes, modificadores de la solubilidad, o de la carga neta, etc) ¹⁷⁰⁻¹⁷⁴.

El uso de NPs como nanovehículos tiene ventajas debido a su tamaño nanométrico, su autoensamblaje y su posible direccionamiento a tejidos específicos ¹⁷⁵. Además, pueden aumentar la solubilidad y aumentar sustancialmente la vida media de circulación de diferentes fármacos ¹⁷⁶⁻¹⁷⁹. Diferentes trabajos han demostrado que es posible la acumulación de NPs en tumores, ya sea de forma pasiva o dirigida ¹⁸⁰. La forma pasiva tiene lugar gracias al efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR, "*enhanced permeation and retention*") que comienza con la inducción del proceso de angiogénesis para satisfacer la mayor demanda de oxígeno y nutrientes del tumor en crecimiento. Esta neovascularización presenta una arquitectura defectuosa, con vasos sanguíneos dilatados y con presencia de poros que permiten la extravasación en el intersticio tumoral. Por otra parte, el drenaje linfático deficiente hace que las macromoléculas sean retenidas dentro del tumor. Este fenómeno EPR es la base del transporte selectivo de fármacos al tumor ¹⁸¹. La vectorización activa se realiza mediante la conjugación de sondas moleculares o ligandos sobre la superficie de los nanosistemas ¹⁸².

Por lo tanto, existen múltiples esfuerzos para diseñar NP que funcionen como nanovehículos, principalmente se ha considerado el uso de liposomas, polímeros sintéticos, dendrímeros y partículas tipo virus (VLPs) ^{178,183}. Las NP basadas en lípidos son la clase más común de nanomedicinas aprobadas por la FDA, también los liposomas que a menudo incluyen modificaciones de su superficie para aumentar su circulación y mejorar la administración, ha permitido su uso en ensayos clínicos. Las micelas poliméricas pueden cargar varios compuestos terapéuticos, desde pequeñas moléculas hasta proteínas, y se han utilizado para la administración de terapias contra el cáncer en ensayos clínicos ¹⁸⁴.

Las NPs poliméricas son las NPs inmunoestimuladoras más utilizadas, y fue el tipo de NP utilizada en esta tesis de doctorado. Los componentes mejor caracterizados en el uso de inmunoterapia del cáncer son con PLGA (ácido poli-láctico-co-glicólico), PGA (ácido poli g-glutámico), PLG (D,L-lactico-co-glicólico), PEG (poli-etilenglicol), PEI (polietilenimina) y NPs de quitosano ¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Estas NP se han empleado ampliamente

como un adyuvante inmunoestimulador eficaz en la vacunación ¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Por ejemplo, Kim y colaboradores demostraron que la encapsulación dentro de las NPs de PLGA del agonista del receptor tipo toll 7/8 (TLR 7/8) aumentó la expresión de las moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 y CD86) en comparación con el control a través de la activación de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) ¹⁹¹. También mostraron que la administración subcutánea de las NPs las conduce a su migración a los ganglios linfáticos drenantes de tumor, donde posteriormente activa las DCs y las células T CD8⁺ (células T citotóxicas), lo que da como resultado una mayor respuesta antitumoral en modelos de vejiga, melanoma y carcinoma renal; demostrando así el papel de las NPs de PLGA como potentes adyuvantes inmunoestimuladores para la inmunoterapia contra el cáncer ¹⁹¹.

En un estudio reciente, Da Silva y colaboradores utilizaron NPs de PLGA para la liberación de dos agonistas de TLRs (ácido poliinosínico-policitidílico ó Poly:IC y Resiquimod) en combinación con MIP3 α (proteína inflamatoria de macrófagos 3 alfa) para mejorar la eficacia terapéutica de las vacunas contra el cáncer en ratones. La co-administración de estos inmunomoduladores modificó significativamente las poblaciones de células linfoides y mieloides en el tumor y en ganglio linfático drenante de tumor. Además, estas nanovacunas mejoraron la supervivencia a largo plazo de los ratones portadores de tumores entre un 75% y un 100% y casi duplicaron el tiempo de supervivencia sin progresión de los ratones ¹⁹².

Existe otro tipo de NPs que son dirigidas a las DCs con el objetivo de facilitar la captación de antígenos y mejorar la presentación cruzada de estos. Como será descrito en los próximos apartados de esta tesis, la activación de las células T vírgenes y de memoria contra antígenos exógenos, como son los antígenos tumorales, depende de la presentación cruzada de antígenos por parte de las DCs, en el contexto del complejo MHC de clase I y el TCR β ⁹. En un contexto de inmunoterapia contra el cáncer, la respuesta disminuida de las células T CD8⁺ representa un obstáculo importante. Varios trabajos publicados muestran que el uso de NPs facilitan la fagocitosis del antígeno exógeno, y en consecuencia la presentación cruzada ¹⁹³⁻¹⁹⁴. La captación y presentación de los antígenos por parte de las DCs es afectado por el tamaño, la carga y la hidrofobicidad de las NP. Las NPs más eficientes en captar los

antígenos y en última instancia mejorar la presentación cruzada de antígenos exógenos, son aquellas que tienen carga superficial positiva¹⁹³, tamaño inferior a 500 nm^{193,195} y potencial para liberar antígeno en el compartimento citosólico^{196,197}. Hirai y colaboradores reportaron que NPs de sílice amorfa con un tamaño entre 70 a 100 nm mejoraron la entrada de antígenos exógenos desde los endosomas y fueron capaces de inducir la presentación cruzada de antígenos. Sin embargo no se obtuvieron los mismos resultados con las partículas de sílice de tamaño mayor a 100 nm¹⁹⁴.

En un estudio reciente, Gong y colaboradores desarrollaron una nanovacuna “transformable” impulsada por protones, que se basa en un conjugado de polímero-péptido, y que generó una fuerte respuesta inmune sin provocar toxicidad sistémica en ratones. La nanovacuna transformable facilitó la administración citosólica a las células del sistema inmune y promovió la presentación cruzada del antígeno. Además fue capaz de activar el inflamasoma NLRP3, aumentando así la inmunidad anti tumoral, a través de una respuesta de células T CD8⁺. Sumado a esto, el tratamiento combinado de la nanovacuna con la terapia con anticuerpo anti-PD-L1 provocó una disminución del crecimiento tumoral y una supervivencia prolongada de animales inyectados con células tumorales como B16F10-OVA y modelos de HPV E6/7 (TC-1)¹⁹⁸.

Los hallazgos esenciales para el desarrollo de la inmunoterapia contra los tumores, mediante el bloqueo de los puntos de control, generó el otorgamiento del Premio Nobel de Medicina en el año 2018 para los investigadores James Allison y Tasuku Honjo. Los BPC han logrado mejorías espectaculares en sobrevida global y sobrevida libre de enfermedad en melanoma metastásico y otros cánceres. Pero como lo comentamos anteriormente, solo una minoría de los pacientes tratados obtiene algún beneficio clínico. Nuestro grupo de trabajo cree que es necesario identificar, caracterizar y manipular nuevos puntos de control en la inmunidad anti-tumoral para lograr vencer mecanismos de resistencia primaria y secundaria a los BPC. Una estrategia para la manipulación de nuevos puntos de control, es intentar modular farmacológicamente la inflamación relacionada con el cáncer. Es por esto, que en el próximo apartado me centraré en el rol de la inflamación en un contexto tumoral.

- *Rol de la Inflamación en la terapia antitumoral*

La activación del sistema inmune adaptativo a través del uso de BPC en células T ha revolucionado la terapia antitumoral. Las estrategias propuestas para lograr vencer mecanismos de resistencia primaria y secundaria intentan conocer el genoma tumoral, la diversidad del receptor TCR, la accesibilidad de las células del sistema inmune al TME, el rol de la inflamación asociada al tumor, entre otros¹⁶⁶.

La inflamación se define como una respuesta de los tejidos vascularizados frente a infecciones y daño tisular, orquestada por el sistema inmune, que consiste en la extravasación de mediadores químicos y células hacia las zonas donde se encuentra el agente extraño o la lesión con la finalidad de resolver la agresión. Para ello, la respuesta inflamatoria consiste en una serie de pasos que inicia en el reconocimiento del agente responsable de la inflamación y sigue con el reclutamiento de células del sistema inmune al sitio donde se ubica dicho agente, la destrucción del mismo, el control de la reacción mediante mecanismos activos con el fin de finalizar la respuesta y finalmente la reparación del tejido dañado⁵⁷.

Los tumores inflamados, enriquecidos de células T citotóxicas infiltrantes que expresan PD-1 se denominan tumores “calientes” y suelen responder bien a los BPC. A su vez, se ha reportado que la inducción de una muerte celular inmunogénica, la cual explicaré más adelante, mediante el uso de determinados quimioterapéuticos mejora la eficacia de los BPC, al transformar tumores inmunológicamente “fríos”, no infiltrados por células T, en tumores “calientes”¹⁹⁹. Por el contrario, los tumores “excluidos” por infiltración se caracterizan por la acumulación de CTL en la periferia de la masa tumoral y una falta de infiltración de CTL en el núcleo del tumor. Estos tumores generalmente se consideran tumores “fríos” con poca sensibilidad a los BPC¹⁶⁶. La inmunoterapia intenta también convertir un tumor “frío” en uno “caliente”, lo que puede incrementar la respuesta a los BPC. Por tanto, existe un interés creciente en modular las vías inflamatorias para mejorar la inmunidad tumoral, particularmente en el contexto de BPC.

La inflamación crónica modela el microambiente tumoral, afectando la plasticidad celular al otorgarle características mesenquimales a las células epiteliales, al polarizar diferentes subtipos de células inmunes, al desdiferenciar células, al sintetizar ROS, citoquinas, o a través de mecanismos epigenéticos y/o de la modulación de cascadas reguladoras en células tumorales y estromales²⁰⁰.

El rol que juega la presencia de la inflamación en el cáncer es complejo y altamente debatido. Por lo tanto se necesita profundizar en la investigación de los mecanismos desencadenados por los BPC para desarrollar biomarcadores predictivos de respuesta. En este contexto, la inflamación es sin duda un factor clave en la inmunidad antitumoral activada por los BPC.

Considerando lo anterior, se ha sugerido, por ejemplo, que desencadenar la vía de STING (proteína transmembrana 173 ó TMEM173; estimulador de genes de interferón) / IFN de tipo I puede ser una estrategia para incrementar la eficacia de la inmunoterapia en ciertos tipos de cáncer¹⁶⁶. Se ha visto en modelos murinos de melanoma que la activación de esta vía es esencial en terapias con α -PD1 y α -CTLA-4 combinadas con quimioterapia, ya que el daño tisular que esta última provoca, activa receptores de ADN citosólico, que finalmente activan la vía STING/IFN tipo I^{201,202}.

Otro ejemplo de respuesta a BPC al inducir inflamación lo muestra la administración de agonistas específicos del receptor tipo Toll 3 (TLR-3), que luego de la terapia con α -PD1 controlan el crecimiento tumoral a través de células T CD8⁺ totales y específicas de tumor^{166,203}.

Los componentes inmunes innatos del TME desempeñan un papel fundamental en la activación y modulación de la respuesta inmune adaptativa contra el tumor. Así, diversos estudios desarrollan estrategias destinadas a modular la actividad de células inmunes innatas en el contexto de la inmunoterapia contra el cáncer, las cuales son un requisito obligatorio para el reclutamiento de células T activadas en el sitio de acción. En este contexto, la activación de los inflamasomas es una función clave mediada por el sistema inmune innato. El rol que cumple el inflamasoma en la inmunidad antitumoral es controvertido, ya que se han descrito efectos anti-tumorales como pro-tumorales²⁰⁴.

La activación del inflamasoma puede llevar a un efecto positivo en la inmunoterapia combinada por ejemplo a quimioterapia. En la quimioterapia se utilizan fármacos que son citotóxicos (por ejemplo, antraciclinas y oxiplatino) que provocan la muerte celular inmunogénica, en la cual se observa una re-localización de la proteína de retículo endoplasmático calreticulina a la membrana celular, la cual actúa como señal “cómeme” al unirse a CD91 en macrófagos y DCs²⁰⁵. Esto le permite a las DCs reconocer la célula que está muriendo e iniciar una respuesta anti tumoral²⁰⁶. En esta muerte celular inmunogénica se da la liberación de ATP que es esencial para el reclutamiento de APCs y la activación subsecuente del inflamasoma para liberar IL-1 β por DCs. La liberación de ATP por la muerte celular inmunogénica media la activación del inflamasoma NLRP3, creando un vínculo entre respuestas inmune innatas y adaptativas. La activación del inflamasoma en DCs lleva a la liberación de IL-1 β , y al reclutamiento posterior de células T $\gamma\delta$ y el “cebado” de células T CD8⁺ contra antígenos tumorales^{206,207}. La muerte celular inmunogénica, mejora la eficacia de los BPC, al transformar tumores inmunológicamente “fríos”, no infiltrados por células T, en tumores “calientes” enriquecidos de células T¹⁹⁹.

Ahora me centraré en los estudios que hemos desarrollado en nuestro grupo de investigación, donde hemos demostrado que la activación del inflamasoma mejora la inmunoterapia en el contexto del bloqueo de PD-1, enfatizando una vez más el rol que tiene la inflamación en el contexto de la inmunoterapia contra el cáncer ¹²⁰.

Actualmente se reconoce que canales iónicos y la homeostasis iónica controlan funciones importantes de las células inmunes, entre las que se encuentra la respuesta inflamatoria. Está fuertemente demostrado que la homeostasis iónica, movilización de K^+ , Ca^{2+} y Cl^- , es crítica en la activación del inflamasoma NLRP3 ^{166,208}. Nuestro grupo mostró en el trabajo recientemente publicado, ¹²⁰, en modelos *in vitro*, que Tmem176b inhibe al inflamasoma NLRP3, ya que el tratamiento con ATP y Nigericina, ambos activadores del inflamasoma NLRP3, inhibieron la secreción de IL-1 β e IL-18, en DCs humanas y de ratón, así como en macrófagos. El mecanismo por el cual Tmem176b controla la activación del inflamasoma parece ser a través de la regulación de la concentración de Ca^{2+} intracelular. Aún más, en modelos experimentales tumorales *in vivo*, la ausencia de Tmem176b en el hospedero resultó en un mejor control de la progresión tumoral. Los tumores fueron rechazados en ratones Tmem176b^{-/-} a través de mecanismos dependientes de la activación del inflamasoma, de células T CD8⁺ y probablemente de células Th17.

Mediante un *screening in vitro*, identificamos a la molécula BayK8644 como un potente inhibidor de Tmem176b; BayK8644 es conocido por modular la actividad de canales de Ca^{++} voltaje dependientes tipo L. BayK8644 induce la secreción de IL-1 β en ratones WT, y es capaz de dar lugar a un rechazo tumoral similar al observado en animales Tmem176b^{-/-}, de una manera dependiente de Tmem176b, caspasa 1/11 y células T CD8⁺.

Además, fue realizado un análisis bioinformático de datos transcriptómicos públicos de biopsias tumorales de pacientes con melanoma tratados con el mAB anti-PD-1, que sugiere que, entre los pacientes progresores, TMEM176B es el único gen relacionado con el inflamasoma regulado positivamente durante el tratamiento, en comparación con la etapa previa al tratamiento. Este análisis muestra que TMEM176B podría estar involucrado en un mecanismo de resistencia a los BPC. Además, mostramos en este trabajo que el tratamiento con BPC en ratones

Tmem176b^{-/-} es más eficaz que en ratones WT, de manera dependiente del inflammasoma. A su vez, la activación del inflammasoma parece ser relevante para la respuesta anti tumoral desarrollada por los BPC, ya que se pierde en los ratones Caspasa-1/11^{-/-}¹²⁰.

En conclusión, observamos una mejor supervivencia y enlentecimiento del crecimiento tumoral cuando el bloqueo farmacológico de TMEM176B se realizó posteriormente al BPC, terapia con anti-PD-1. Por el contrario, la inhibición de TMEM176B antes del tratamiento con mAb anti-PD-1 no mejoró la eficacia del BPC. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el momento de la activación del inflammasoma podría ser crucial en la modulación de la inmunidad activada por el anticuerpo anti-PD-1¹⁶⁶.

En este sentido, un estudio reciente confirmó la relevancia de la activación del inflammasoma en el desarrollo de la inmunidad antitumoral, en el contexto de la terapia de bloqueo de PD-1. Para esto utilizaron un anticuerpo anti-CD39 en modelos de cáncer de colon en ratón. CD39 es una enzima extracelular que a partir de AMP convierte ATP extracelular (eATP), un activador del inflammasoma NLRP3²⁰⁹. Los autores muestran el control del cáncer de colon de ratón inducido con células MC38 en animales salvajes (WT), pero el efecto se pierde en animales que no poseen Caspasa-1/11, NLRP3, PyCard ó P2X7r. Sin embargo, no está claro si la inyección del anticuerpo anti-CD39 administrada antes o después de la terapia con mAb anti-PD-1, podría llevar a diferentes resultados clínicos¹⁶⁶.

También en el estudio de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) se ha investigado como afecta la activación del inflammasoma en la inmunoterapia, ya que solo una subpoblación de pacientes responde a esta terapia. Recientemente Douguet y colaboradores mostraron que el uso de un agonista del receptor purinérgico P2X7 (P2X7R) fue capaz de controlar el crecimiento tumoral. El P2X7R es un canal iónico activado por ATP que se expresa predominantemente en células inmunes y en algunas células tumorales. Las funciones de P2X7R fueron descritas en células inmunes, donde participa en la activación de NLRP3 para inducir la maduración y secreción de citocinas proinflamatorias de IL-1 β e IL-18 por macrófagos y DCs²¹⁰. El agonista de este receptor estimuló la inmunidad antitumoral, al inducir la síntesis de IL-18 por DCs. La IL-18 genera la producción de IFN- γ aumentando la respuesta

inmune anti-tumoral y potenció células T NK, TCD4⁺ y T CD8⁺. La acción combinada de este agonista con la inmunoterapia con anticuerpo α PD-1 mejoró la supervivencia de animales con cáncer de pulmón. La regresión del tumor se correlacionó con una mayor infiltración de células inmunes, mayor secreción de IL-18 dentro del TME y una mayor expresión de PD-L1 por las células tumorales. Además, este modo de acción fue confirmado también utilizando el modelo de tumor de melanoma B16-F10²¹¹.

Con el objetivo de obtener un mayor beneficio clínico en el uso de inmunoterapias, actualmente es altamente debatida la importancia de la secuencia y el momento en el cual realizar el bloqueo de puntos de control inmunológico (terapias como α -CTLA-4 ó α -PD-1) y cómo combinarlos con el uso de tratamientos para la modulación de las respuestas inflamatorias.

En este contexto, el análisis en biopsias de melanoma humano antes de la administración combinada de terapia con anticuerpo anti-CTLA4/anti-PD1 reveló una firma transcriptómica de IFN tipo I, que se asoció a falta de respuesta a la terapia. Esto posiciona la vía del IFN tipo I como un potencial mecanismo de resistencia a la terapia con BPC. Sin embargo, en biopsias de melanoma humano realizadas durante el tratamiento temprano con anti-PD-1, la firma transcriptómica de IFN de tipo I se asoció con mejores respuestas clínicas. En conclusión, el resultado clínico final de un paciente tratado con inmunoterapia, mAb anti-PD1, depende del momento en que el IFN de tipo I es producido y liberado. Se necesita profundizar en los estudios para determinar el tiempo en que es deseable o no que se active la vía del IFN de tipo I en dichos pacientes¹⁶⁶.

Se ha descrito en modelo murino de cáncer de mama, utilizando una línea tumoral (células 4T1), que los animales deficientes de IL-1 β presentan un aumento en la inmunidad anti-tumoral, con efecto sinérgico con el bloqueo de PD-1. Esto no fue evaluado en otros tipos de tumores transplantables y los autores atribuyen el efecto al aumento de células del sistema inmune innato en el TME²¹².

Un ensayo clínico en humanos, CANTOS, vinculó la inhibición de la IL-1 β con una menor incidencia de cáncer de pulmón en pacientes con aterosclerosis. Dicho

bloqueo se realizó con un mAb, Canakinumab. Los pacientes al ingresar al ensayo no poseían ningún tipo de cáncer, y se observó que el Canakinumab prevenía eventos vasculares luego de sufrir infarto de miocardio ²¹³.

Objetivos

El rol que juega la inflamación en el cáncer es complejo y altamente debatido^{166,214}. Nuestro grupo de trabajo ha reportado que la liberación del inflamasoma NLRP3 favorece las respuestas inmunes anti-tumorales espontáneas y desencadenadas por el BPC. En ese contexto, hemos caracterizado la proteína intracelular Tmem176b como un regulador iónico del inflamasoma NLRP3. Sin embargo, existen una serie de puntos importantes en relación a ese mecanismo que aún no han sido dilucidados. Particularmente, si bien Tmem176b está expresado en cDC1 y cDC2, no conocemos el impacto que podría tener la inhibición de Tmem176b en esas subpoblaciones de DCs. Como se explicó en la introducción, existe una especialización funcional entre las subpoblaciones de DCs. De esa manera, la inhibición de Tmem176b en cDC1 y cDC2 podría tener consecuencias diferentes en ambas subpoblaciones, pudiendo desencadenar o incluso inhibir respuestas inmunes adaptativas anti-tumorales. Nos interesa abordar dos resultados previos de nuestro grupo que creemos son importantes para definir a Tmem176b como blanco en inmunoterapia oncológica. Primero, a diferencia de la respuesta anti-tumoral observada al inhibir farmacológicamente a Tmem176b con BayK8644 en un protocolo profiláctico, no se observó una respuesta anti-tumoral eficiente cuando el modelo fue terapéutico. Y segundo, nos resulta contraintuitivo que Tmem176b favorezca la presentación cruzada de antígenos en DCs (especialización funcional de las cDC1), al mismo tiempo que inhibe la inmunidad anti-tumoral en modelos murinos.

El objetivo general de esta tesis es estudiar el impacto de la inhibición de Tmem176b en cDC1 y cDC2 para poder desarrollar estrategias que permitan mejorar el efecto anti-tumoral del BayK8644 y/o identificar mecanismos inmunológicos desencadenados por el bloqueo de Tmem176b.

Considerando lo anterior, nos planteamos así dos objetivos específicos para esta tesis.

- ***Objetivos específicos***

Objetivo específico 1:

Estudiar y mostrar como potenciar la respuesta antitumoral mediante el desarrollo de nanopartículas de quitosano que contienen al BayK8644 (NP-BayK8644). Mediante el uso de esta formulación nanotecnológica de BayK8644, favorecer el mecanismo de presentación cruzada de antígenos en cDC1 y mantener la capacidad del compuesto de desencadenar la activación del inflamasoma NLRP3.

Objetivo específico 2:

Demostrar la importancia de las cDC2, en el efecto anti-tumoral inducido al inhibir Tmem176b, mediante delección génica ó farmacológicamente con BayK8644. Estudiar el efecto de las cDC2 sobre la diferenciación a células con un fenotipo Th17 y estudiar el rol de las células Th17 en la respuesta anti-tumoral generada por la terapia con BPC.

Materiales y métodos

- *Reactivos y Anticuerpos*

Los reactivos y anticuerpos utilizados en esta tesis se detallan en el **Tabla 2**, página 74.

- *Animales*

Se utilizaron ratones C57BL/6 Tmem176b^{+/+} y Tmem176b^{-/-} “littermates”, ó Tmem176b^{-/-}Caspasa-1^{-/-} de entre 6 y 10 semanas (Jackson Lab; Bar Harbor, ME) de sexo indistinto. Los ratones fueron criados en la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) del Institut Pasteur de Montevideo en condiciones libres de patógenos específicos (SPF). Éstos fueron mantenidos en un ambiente controlado, con temperatura entre 19 y 21°C, y ciclos de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Los ratones recibieron agua y ración estéril administradas en condiciones *ad libitum*. Los ratones Tmem176b^{-/-} se generaron en la cepa 129/SvJ y los ratones heterocigotos se retrocruzaron durante 10 generaciones en el fondo C57BL/6 (Janvier, Saint Berthevin, Francia) como se informa en ⁹⁷. Los ratones Tmem176b^{-/-}Caspasa-1^{-/-} se generaron microinyectando Crispr/Cas9 dirigidos a Caspasa-1 en embriones Tmem176b^{-/-}. Se genotiparon animales F1 y se cruzaron ratones heterocigotos para generar animales Tmem176b^{-/-}Caspasa-1^{-/-} homocigotos F2. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la normativa local y aprobados por la Comisión de Ética (CEUA) del Institut Pasteur de Montevideo.

- *Cultivo de líneas celulares*

La línea celular E.G7-OVA (ATCC® CRL-2113™, linfoma tímico de origen murino) fue cultivada en medio DMEM suplementado con 10% suero bovino fetal (SBF), HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM, MEM-aminoácidos no esenciales 1%, β-mercaptoetanol

0.05 mM, penicilina/estreptomicina 100 unidades/mL, 0.4 mg/mL de geneticina y 1mM de L-glutamina. Se mantuvo en estufa a 37°C en presencia de 5% de CO₂ y se realizaron pasajes cada 3 días para mantener el cultivo en fase exponencial.

La línea celular B3Z, (linfoma tímico de origen murino) fue cultivada en medio RPMI suplementado con 10% suero bovino fetal (SBF), HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM, MEM-aminoácidos no esenciales 1%, β-mercaptoetanol 0.05 mM, penicilina/estreptomicina 100 unidades/mL y 1mM de L-glutamina. Se mantuvo en estufa a 37°C en presencia de 5% de CO₂.

- ***Modelos tumorales y tratamientos con NP-BayK8644, eNP o BayK8644 libre.***

Se inyectaron ratones Tmem176b y Tmem176b^{-/-} C57BL/6 subcutáneo con 0.5 x 10⁶ células de linfoma tímico E.G7-OVA. En el experimento indicado, la inyección se realizó alternando un ratón Tmem176b y un Tmem176b^{-/-} hasta completar ambos grupos. Al recibir el tratamiento, se alternó entre animales tratados con BayK8644 y con vehículo o animales tratados con NP-BayK8644 y eNP. El crecimiento del tumor se midió con calibre manualmente cada 2 días y se tomaron los dos diámetros principales del tumor. Se administraron por vía intra-tumoral 70 nmoles de BayK8644 libre, BayK8644 encapsulado en nanopartículas de quitosano, o la misma cantidad de NPs vacías a los días +2, +4, +6, +8, +10 después de la primera inyección. Los ratones se sacrificaron cuando uno de los diámetros principales del tumor alcanzó los 2 cm.

- ***Cultivo primario de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs)***

Para la obtención de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs) se realizó el protocolo descrito por Segovia y colaboradores²¹⁵. Para esto se extrae la médula ósea de los fémures y tibias de ratones Tmem176b^{+/+} (WT) y Tmem176b^{-/-}. Luego de lisar los glóbulos rojos, se siembran 5,0x10⁶ células por placa de Petri, en medio RPMI

suplementado (10% de suero fetal bovino, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM, MEM-aminoácidos no esenciales 1%, 1mM L-glutamina, β -mercaptoetanol 0.05 mM, penicilina/estreptomina 100 unidades/mL) con 0.4 ng/mL de GM-CSF. Al día 3 y 6, se renueva el medio de crecimiento, agregándole GM-CSF al cultivo cada vez.

- ***Estudio de la presentación cruzada en células dendríticas esplénicas de ratón.***

Para la obtención de DCs esplénicas, se extrajo el bazo de ratones C57Bl6, se cortó en trozos pequeños y se trató con colagenasa-D (Roche, Merck). A los 30 minutos de incubación a 37°C, se detuvo la reacción enzimática con una solución de EDTA (concentración final 10mM). Se realizó lisis de glóbulos rojos con una solución de cloruro de amonio. Finalmente los esplenocitos se lavaron con PBS/SFB1%. Para el aislamiento de células CD11c⁺ se utilizaron anticuerpos monoclonales anti CD11c murinos acoplados a microesferas magnéticas suministradas en el kit comercial "CD11c MicroBeads UltraPure, mouse" (Miltenyi Biotec Inc, Auburn, CA, USA) conforme el protocolo sugerido por el fabricante. Brevemente, las células esplénicas fueron marcadas con anticuerpos anti-CD11c conjugados a las esferas, se hicieron pasar por una columna magnética sometida a un campo magnético y así fueron retenidas en la columna. Para la obtención final de estas, la columna se retira de la influencia del campo magnético y las células son eluidas de la columna con ayuda de un émbolo. Después de la obtención de la fracción CD11c⁺ la pureza de la muestra fue confirmada mediante la técnica de citometría de flujo.

Las células esplénicas CD11c⁺ fueron incubadas durante 4 horas en medio RPMI suplementado con diferentes concentraciones de proteína OVA soluble (endogradeOvalbumin, LIONEX, Diagnostics and Therapeutics, DE), con el péptido OVA (257-264; SIINFEKL) (InvivoGen) a diferentes concentraciones ó con el compuesto BayK8644 libre (R&D Systems). En ciertas condiciones, sumado al tratamiento con la proteína OVA soluble, se adicionó determinada concentración de nanopartículas de quitosano, cargadas con el compuesto BayK8644 (NP-BayK8644) o

su contraparte vacía eNP. Luego las células fueron lavadas con PBS/BSA1% y fijadas con glutaraldehído 0,008 % durante 3 minutos en hielo. Posteriormente se realizó un lavado con una solución de glicina (0,2 M) y luego con PBS. Finalmente las células esplénicas CD11c⁺ se incubaron con la línea celular B3Z (línea celular hibridoma de células T) durante 18 horas a 37°C y 5% de CO₂ en estufa.

La utilización de la línea celular B3Z específica para el péptido OVA (SIINFEKL), en asociación con la molécula MHC I permite estudiar la activación de dichas células T, y fue amablemente proporcionada por el Dr. Ignacio Cebrián del Laboratorio de Fusión de Membranas, IHEM-CONICET; Facultad de Ciencias Médicas, UNCuyo.

La línea celular B3Z es un hibridoma de células T inducibles por b-galactosidasa (lacZ). Están transfectadas establemente con la construcción quimérica Dectin-1-CD3 ζ (región extracelular de Dectin-1 fusionada a la región citoplasmática de CD3 ζ). Estas células, además, se transfectan transitoriamente con un gen reportero NFAT-LacZ (factor nuclear NFAT de células T activadas, fusionado al gen lacZ de E. coli); ya que CD3 ζ dispara una señal intracelular que conduce a la activación del factor transcripcional NFAT. Estudios previos demostraron que el gen heterólogo de Escherichia coli β-galactosidasa (lacZ), bajo el control de la región potenciadora completa de IL-2 o el factor nuclear en el elemento de las células T activadas (NFAT) solo, se induce específicamente en las células T transfectadas y activadas. Por lo tanto, la activación de las células T transfectadas, resulta en la síntesis de los productos de los genes IL-2 y lacZ. La activación de dichas células T (B3Z) se midió detectando la actividad de β-galactosidasa por densidad óptica a 590 nm utilizando clorofenol rojo-β-D-galactopiranosido (CPRG; Roche) como sustrato para la reacción.

- ***Nanopartículas de quitosano (NPs) cargadas con BayK8644 (NP-BayK8644) ó con la sonda 6-coumarin (NP-6cou).***

I. Síntesis

La síntesis de nanopartículas de quitosano fue realizada mediante la técnica de desplazamiento de solvente reportado por Torrecilla *et al.*¹⁸⁶, donde una fase

orgánica (que contiene lecitina de soja, crodamol (aceite neutro de ácidos grasos caprílico y cáprico) y acetona) se vierte sobre una fase acuosa (que contiene 10 mg de quitosano y 50 mg de un polímero de PEG (poloxamer 188), para dar lugar a una emulsión que luego se rotavapora para eliminar el solvente orgánico. La Preparación de las nanopartículas de quitosano peguiladas vacías (eNP) y cargadas con BayK8644 (NP-BayK8644) ó con la sonda 6 coumarin (NP-6cou) se preparan a partir del quitosano-PEG y se añaden 0.5 mL de una solución etanólica de BayK8644 (20 mg/mL) ó 1 mL de una solución etanólica de 6-coumarin (0.2 mg/mL) a la fase orgánica.

II. Caracterización fisicoquímica

Tamaño de la partícula, potencial Z e índice de polidispersidad (PDI)

El diámetro hidrodinámico, el potencial zeta y el índice de polidispersidad (PDI) de las NPs se obtuvieron usando un Nano-ZetaSizer (Malvern Instruments Ltd., UK). Los análisis se realizaron en medio acuoso a 25°C, viscosidad de 0,8872 cP y RI de 1,33. El tamaño de partícula se leyó en términos de z-promedio y el potencial zeta se calculó a partir de la movilidad electroforética medida usando la ecuación de Helmholtz-Smoluchowski. Las muestras se analizaron por triplicado.

Estudio de la eficiencia de encapsulación de las NP-BayK8644.

La eficacia de encapsulación de BayK8644 en las NPs se determinó indirectamente por la diferencia entre la cantidad total de BayK8644 en la formulación y el fármaco libre que se encuentra en el sobrenadante de la formulación. La cantidad total de fármaco se estimó disolviendo una alícuota de NP-BayK8644 en acetonitrilo y se midió con un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El fármaco no encapsulado se determinó luego de realizar una ultracentrifugación y medir en el sobrenadante de la misma por HPLC el compuesto BayK8644.

Para las medidas de HPLC se utilizó un Thermo Scientific Ultimate 3000 equipado con un detector UV ajustado a 410 nm y una columna Zorbax Extend 300 C18 de fase

inversa (4,6 x 150 mm d.i., tamaño de poro 3,5 μm Agilent, EE. UU.). La fase móvil consistió en una mezcla de acetonitrilo:agua (50:50 v/v). Las curvas de calibración estándar de BayK8644 fueron lineales ($r^2 > 0.999$) en el rango de concentraciones entre 0.1-1.4 $\mu\text{g/mL}$.

Análisis de la Morfología de las NPs

La morfología de las NPs se examinó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), JEOL JEM-1010. Las muestras se tiñeron con una solución de ácido fosfotúngstico al 2% (p/v) y se colocaron sobre rejillas de cobre (malla-200) para su visualización mediante TEM.

Espectroscopía de Raman de las NP-BayK8644 y eNP

La formación de las NPs se analizó mediante espectroscopia confocal Raman realizada utilizando un microscopio confocal Raman WITec Alpha 300-RA 202 (WITec GmbH, Ulm, Alemania). Todas las muestras (eNP, NP-BayK8644 y BayK8644) se colocaron en una oblea de silicio utilizada como sustrato y se secaron al aire durante 24 horas.

Estudio in vitro de liberación del BayK8644 de la NP-BayK8644.

Se utilizó el método de diálisis dinámica para evaluar el comportamiento de liberación del BayK8644 in vitro. En resumen, se colocaron 0.5 mL de muestra en una bolsa de diálisis (corte 2KDa) y se dializaron contra PBS (pH 7.4 y 6.0) o buffer acetato (pH 5), que puede simular la condición fisiológica y el comportamiento de liberación intracelular. A continuación, se agitó la bolsa de diálisis a 120 rpm a 37°C y se extrajo 1 ml de dializado de la muestra a intervalos de tiempo predeterminados. Para mantener un volumen constante, se reemplazó un volumen igual de medio fresco. La concentración de BayK8644 liberada se determinó mediante HPLC.

- ***Captación de NPs por las células detríticas de la médula ósea (BMDC).***

Al día 8 de cultivo, las BMDCs se recogieron en una solución que contenía SFB y EDTA. Para los ensayos de microscopía confocal, se sembraron nuevamente $1,0 \times 10^5$ células en una placa de 12 pocillos, en los cuales se colocaron previamente cubreobjetos de vidrio. Las células se dejaron adherir durante 1,5 horas y se estimularon durante 30 minutos con NP-6cou a 37 °C para permitir el proceso de endocitosis, o a 0 °C (como control negativo), se lavaron y luego se mantuvieron durante 15 minutos en las mismas condiciones con medio fresco. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio láser confocal de barrido semiespectral Zeiss LSM 800™ (Beckman Coulter).

Para los estudios de internalización por citometría de flujo, se siguió el mismo protocolo mencionado anteriormente. Se recogieron las BMDCs y las muestras se adquirieron con un citómetro de flujo Cyan ADP equipado con un láser de 488 nm y un filtro de banda (530/40 nm), que permitió evaluar la fluorescencia de la sonda 6-coumarin. Para el análisis de datos se utilizó el software FlowJo v.X (BD, Ashland, OR, EE. UU.).

- ***Estudios de localización por microscopía confocal***

Las BMDC derivadas de animales Tmem176b^{+/+} y Tmem176b^{-/-} C57BL/6 se sembraron en placas de 12 pocillos (1×10^5 células/pocillo) que contenían cubreobjetos de vidrio y se cultivaron durante 1,5 horas. Luego, las células se trataron con NP de 6-cou durante 30 minutos, se lavaron y se mantuvieron durante 15 minutos con medio de mantenimiento fresco. Las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 2% (p/v) durante 15 minutos, se permeabilizaron y se bloquearon usando TritonX100 al 0,1%, BSA al 3% en PBS. Se utilizó el anticuerpo primario, anticuerpo policlonal anti-Tmem176b de conejo (Grupo Proteintech) a una concentración de 5 µg/ml, o un

anticuerpo IgG control, diluido en solución BSA-PBS-TritonX100 y se incubó overnight a 4 °C. Se realizaron tres pasos de lavado usando solución de PBS. Luego se añadió anticuerpo secundario IgG (H + L) Biotina-donkey anti-conejo diluido 1:500 en BSA-PBS-TritonX100 y se incubó durante 1,5 horas. Después del lavado, las células se incubaron con estreptavidina-Alexa Fluor 568 (Molecular Probes) diluido 1:1000 en BSA-PBS-TritonX100. Finalmente, los núcleos se tiñeron con DAPI diluido 1: 5000 (Life Technologies), el cual fue incubado durante 5 minutos. Se utilizó ProLong (Molecular Probes) como medio de montaje. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio láser confocal de barrido semiespectral Zeiss LSM 800™ (Beckman Coulter).

- ***Cuantificación de la Activación Inflammasoma***

Como una lectura de la activación del inflammasoma NLRP3 *in vitro*, se cuantificó la IL-1 β en el sobrenadante de cultivo de BMDCs. Como se mencionó anteriormente, al día 8 de cultivo de las BMDCs, se colectaron y sembraron $5,0 \times 10^4$ BMDCs en una placa de 96 pocillos y se dejaron adherir durante 1,5 horas. Luego, las células se estimularon durante 3 horas con 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS, se lavaron y trataron durante 2 horas con las dosis indicadas de BayK8644 libre, NP-BayK8644 y eNP. Se recolectó el sobrenadante de cultivo para determinar la presencia de IL-1 β con un kit de ELISA, según el protocolo del fabricante (Biolegend, 432603).

Para determinar la activación de Caspasa-1 por la técnica de Western blot, al día 8 de cultivo de las BMDCs, se recolectaron en una solución que contenía SFB y EDTA, se sembraron $2,0 \times 10^6$ de BMDCs en una placa de 6 pocillos y se dejaron adherir durante 1,5 horas. Luego, las células se estimularon en ausencia de SFB durante 3 horas con 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS, se lavaron y trataron durante 2 horas con las dosis indicadas de NP-BayK8644 y eNP. Los sobrenadantes de cultivo de las BMDC se precipitaron con TCA al 20% (v/v) y se lavaron con acetona. Se generaron lisados celulares con tampón RIPA en presencia de un cóctel inhibidor de proteasas. Los lisados celulares y los precipitados de los sobrenadantes de cultivo se sometieron a

electroforesis, se transfirieron y se tiñeron con anticuerpos anti-caspasa-1 (Adipogen, AG-20B-0042). La cuantificación se realizó mediante el software ImageJv.1.5i.

La activación de caspasa-1 también se cuantificó en cultivo de BMDCs derivadas de animales *Tmem176b^{+/+}* mediante la técnica de citometría de flujo. Como se mencionó anteriormente, en el día 8, las BMDC se sembraron (5.0×10^5 células/pocillo) en placas de cultivo de 35 mm y se dejaron adherir durante 1,5 horas. Las células se estimularon durante 2 horas con 100 μ M de BayK8644libre, NP-BayK8644 y eNP y luego se lavaron. Las BMDCs se tiñeron con FLICA-1 (Kit FLICA 660 Caspase-1, ImmunoChemistry) durante 30 minutos a 37 °C y se analizaron utilizando un citómetro de flujo Cyan ADP equipado con un láser de 633 nm y un filtro de banda (670LP). Para el análisis de datos se utilizó el software FlowJo v.X (BD, Ashland, OR, EE. UU.).

Para el análisis de Caspasa-1 activa utilizando la sonda FLICA-1 en modelos *ex vivo*, animales *Tmem176b^{+/+}* se inyectaron subcutáneamente con 5.0×10^5 células de la línea EG7.OVA. Cuando el tamaño de los tumores alcanzó 5 mm en su diámetro más largo, se inyectó intra-tumoralmente cada 2 días 70 nanomoles de BayK8644 encapsulado en NPs o el mismo volumen de NP vacías (eNP). 24 horas después de la tercera dosis de NPs se extrajeron los TDLN para análisis mediante la técnica de citometría de flujo. Los TDLN fueron colocados en una solución de PBS/SFB/Azida de sodio y luego se filtraron por una membrana de 50 μ m de poro. Se determinaron las células viables y mediante la exclusión de dobletes, exclusión de células T, B y NK se analizó la población de DCs. Dentro de la población MHC-II⁺ y CD11c⁺ se analizó el porcentaje de células FLICA-1⁺.

- ***Análisis ex vivo de células T CD8⁺ totales y específicas de antígeno tumoral .***

Se inyectaron animales *Tmem176b^{+/+}* subcutáneamente con 5.0×10^5 células de la línea EG7.OVA. Cuando el tamaño de los tumores alcanzó 5 mm en su diámetro más largo, se inyectó intra-tumoralmente cada 2 días 70 nanomoles de BayK8644

encapsulado en NPs o el mismo volumen de NP vacías (eNP). 24 horas después de la tercera dosis de NPs se extrajeron los tumores y los TDLN para análisis mediante la técnica de citometría de flujo. Los TDLN fueron colocados en una solución de PBS/SFB/Azida de sodio y luego se filtraron por una membrana de 50 μm de poro. El tejido tumoral se aisló y se disoció en presencia de colagenasa D (1 mg/ml) (Roche-Merck) durante 10 min a 37 °C. La reacción se detuvo con EDTA (concentración final 10 mM) y la suspensión se filtró a través de una membrana de poro de 50 μm . Después de la lisis de glóbulos rojos, se realizó el análisis de citometría de flujo. Para esto las suspensiones de células individuales se tiñeron con anticuerpos contra las moléculas de superficie CD8 α -APC-Cy7, TCR β -PE, CD19-PerCPy5.5, OVA-pentámero-APC y TCRv β 12-FITC, éste último para discriminar células tumorales EG.7-OVA. Se determinaron las células viables y mediante la exclusión de dobletes se analizó el porcentaje y el número absoluto de células T CD8 $^+$ TCR β^+ , ó células T CD8 $^+$ TCR β^+ OVA $^+$, específicas para el antígeno tumoral. Todos los datos se adquirieron en un FACS Aria Fusion (BD Biosciences) y se analizaron con el software FlowJo (software FlowJo v.X (BD, Ashland, OR, EE. UU.).

Dentro del grupo de animales tratados con NP-BayK8644 se realizó una clasificación de acuerdo a la cinética de crecimiento tumoral. Los animales que al momento de la resección su tumor no había duplicado el tamaño inicial (primera inyección de NPs), se denominaron Respondedores y, aquellos animales que no controlaban el tamaño del tumor se denominaron Progresores.

- ***Análisis de la expresión génica en el TME por RT-PCR cuantitativa.***

Se inyectaron animales Tmem176b $^{+/+}$ subcutáneamente con 5.0×10^5 células de la línea EG7.OVA. Cuando el tamaño de los tumores alcanzó 5 mm en su diámetro más largo, se inyectó intra-tumoralmente cada 2 días 70 nanomoles de BayK8644 encapsulado en NPs. 24 horas después de la tercera dosis de NPs se extrajeron los tumores para analizar por RT-PCR cuantitativa la expresión de *Ido1*, *Rorc*, *Tgf- β* , *Foxp3*, *Gata-3*, *Il-4*, *Ctla-4* e *Ifng*, normalizada por *Gapdh* ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$). Para la RT-PCR

cuantitativa se aisló el ARN total de los tumores usando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). La transcripción reversa se realizó utilizando M-MLV “Reverse Transcriptase” y *primers* aleatorios siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). La expresión génica se evaluó con el reactivo Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los *primers* de ratón utilizados en este estudio se diseñaron todos sobre diferentes exones para evitar la amplificación del ADN genómico. La PCR en tiempo real se realizó utilizando el sistema Eco Real-Time PCR System (Illumina). La expresión génica se normalizó usando gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*) y se expresó en unidades arbitrarias usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ²¹⁶.

- ***Evaluación in vitro, de la capacidad de las BMDCs de diferenciar células T CD4⁺ a un fenotipo Th17.***

Análisis del fenotipo de las BMDCs

Se determinó el fenotipo al día 8 de cultivo de las BMDCs derivadas de animales *Tmem176b^{+/+}* y *Tmem176b^{-/-}* por citometría de flujo. Para la caracterización se analizaron marcadores de diferenciación y maduración, CD11c, MHC clase II, CD80 y CD86 como descrito por ²¹⁵. Además se adicionó al mix de marcado los anticuerpos anti-CD172 α y XCR1 para discriminar las subpoblaciones de cDCs, tipo 1 y 2. Todos los datos se adquirieron en un FACS Aria Fusion (BD Biosciences) y se analizaron con el software FlowJo (software FlowJo v.X (BD, Ashland, OR, EE. UU.).

Evaluación de la capacidad de las BMDCs de diferenciación de células T CD4⁺ a células Th17.

Al día 8 de cultivo de BMDCs derivadas de animales *Tmem176b^{+/+}*, *Tmem176b^{-/-}* ó *Tmem176b^{-/-}Caspasa-1^{-/-}*, se recogen y se siembran $2,0 \times 10^4$ BMDCs por pocillo, en una placa de 96 wells de fondo redondo. Se estimulan con 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS overnight. Luego de lavar con PBS, las células son cargadas con el péptido SIINFEKL

OVA-II (323-339) en medio RPMI suplementado con durante 45 minutos a 37°C y 5 %CO₂ en estufa.

Para la obtención de células CD4⁺ esplénicas, se extrajo el bazo de ratones OT-II, se cortó en trozos pequeños y se trató con colagenasa-D (Roche, Merck). A los 30 minutos de incubación a 37°C, se detuvo la reacción enzimática con una solución de EDTA 10mM. Se realizó lisis de glóbulos rojos con una solución de cloruro de amonio. Finalmente los esplenocitos se lavaron con PBS/SFB1%. Para el aislamiento se utilizaron anticuerpos monoclonales anti CD4 murinos acoplados a microesferas magnéticas suministradas en el kit comercial “CD4 MicroBeads UltraPure, mouse” (Miltenyi Biotec Inc, Auburn, CA, USA) conforme el protocolo sugerido por el fabricante. 1,0x10⁵ células CD4⁺ se incubaron con 2,0x10⁴ BMDCs durante 5 días a 37°C y 5% de CO₂ en estufa. Al día 3 de cultivo se le adicionó IL-2 al cultivo. Al quinto día de cultivo el cultivo se estimula durante 3 horas con PMA (50 ng/mL) y luego 4 horas de estímulo con ionomicina, 1 µg/mL. Luego se evaluó por citometría de flujo el porcentaje de células Th17, analizando la expresión de la citoquina IL-17 dentro de la población CD4⁺.

- ***Evaluación ex vivo, de la capacidad de las cDC2 de diferenciar células T CD4⁺ a un fenotipo Th17.***

Los animales fueron inyectados con células EG.7-OVA según mencionado anteriormente en “Modelos tumorales” de esta sección. Se utilizaron los siguientes grupos: Tmem176^{+/+} vs Tmem176b^{-/-}; Tmem176b^{-/-} vs Tmem176b^{-/-}Caspasa-1^{-/-}; tratamiento durante 10-12 días con BayK8644 (70 nmoles diarios) o su vehículo control por vía i/p. Se realizó la extracción de los TDLN de los animales, se cortaron en trozos pequeños y se trató con colagenasa-D (Roche, Merck). A los 20 minutos de incubación a 37°C, se detuvo la reacción enzimática con una solución de EDTA 10mM.

Se realizó la separación celular por citometría de flujo (FACS) mediante un separador celular FACS Aria Fusion (BD) de cada subpoblación de cDC2 provenientes de TDLN, migradoras y residentes. Para la obtención de células CD4⁺ esplénicas se procedió como lo mencionado en el ítem anterior, mediante el uso de un kit de CD4⁺ Miltenyi. Luego se cultivaron independientemente las subpoblaciones de cDC2 provenientes de cada tipo de animales con células T derivadas de ratones OT-II, en una relación 1:5 y se adicionó la citoquina IL-2 al tercer día de cultivo. Al quinto día de cultivo el cultivo se estimula durante 3 horas con PMA (50 ng/mL) y luego 4 horas de estímulo con ionomicina, 1 µg/mL. Luego se evaluó por citometría de flujo el porcentaje de células Th17, analizando la expresión de la citoquina IL-17 dentro de la población CD4⁺.

- ***Transferencia adoptiva de células (ACT) con un perfil Th17***

Generación in vitro de células Th17 con un perfil efector.

Para la obtención de células CD4⁺ esplénicas, se extrajo el bazo de ratones OT-II, se cortó en trozos pequeños y se trató con colagenasa-D (Roche, Merck). A los 30 minutos de incubación a 37°C, se detuvo la reacción enzimática con una solución de EDTA 10mM. Se realizó lisis de glóbulos rojos con una solución de cloruro de amonio. Finalmente los esplenocitos se lavaron con PBS/SFB1%. Para el aislamiento se utilizaron anticuerpos monoclonales anti CD4 murinos acoplados a microesferas magnéticas suministradas en el kit comercial “CD4 MicroBeads UltraPure, mouse” (Miltenyi Biotec Inc, Auburn, CA, USA) conforme el protocolo sugerido por el fabricante. Se sembraron 2,0x10⁶/mL de células CD4⁺ en placas de petri de 100mm y se mantuvieron durante 5 días con las siguientes citoquinas: IL6 (30 ng/mL), IL-1β (20 ng/mL), IL-23 (50 ng/mL), anti-IFNγ (10 µg/mL) y 1 µg/mL del péptido SIINKEKL OVA-II (323-339). Al día 3 de cultivo se adicionó IL-2 (5 ng/mL).

ACT de células Th17 con un perfil efector.

Animales C57BL6 WT fueron inyectados subcutáneamente con $5,0 \times 10^5$ células de la línea EG7.OVA el día 0, y 250 μg de anti-PD1 por vía i/p los días 6, 9 y 12. El día 9 un grupo se transfirió adoptivamente con $5,0 \times 10^6$ de células con un fenotipo Th17 i.v., y el otro grupo recibió PBS i.v.

- ***Citotoxicidad in vivo contra células que expresan el antígeno tumoral***

Los esplenocitos de ratones C57BL/6 vírgenes o “*näive*” se tiñeron diferencialmente con una sonda DDAO a 0,8 mM (“alto”) o 0,08 mM (“bajo”). La población de DDAO alta se cargó durante 60 min a 37°C con péptido SIINFEKL OVA-I (257-264) 50 μM . Después de tres lavados, la población alta y baja se mezclaron en una proporción de 1: 1. La mezcla de células ($2,0 \times 10^6$) se inyectaron por vía i.v en ratones portadores (o no “*näive*”) de tumores a los cuales se les realizó la transferencia adoptiva de células Th17 más el anticuerpo α -PD-1 o PBS más el anticuerpo α -PD-1. Cuatro horas más tarde, los ratones se sacrificaron y se cosecharon los bazo. Los esplenocitos se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar las poblaciones altas y bajas de DDAO. La citotoxicidad específica se calculó utilizando la siguiente fórmula:

Porcentaje de lisis específica = $(1 - [r_{\text{naive}}/r_{\text{portador de tumor}}]) \times 100$.

$r = \% \text{ de células DDAO}_{\text{bajo}} / \% \text{ de células DDAO}_{\text{alto}}$.

- ***Análisis estadístico***

Los análisis estadísticos fueron realizados por GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Los análisis de supervivencia se realizaron con la prueba Log-rank (Mantel-Cox). La comparación de dos condiciones experimentales se realizó con la prueba t de Student para datos no apareados. La comparación de múltiples condiciones se realizó con pruebas ANOVA de una vía. Las diferencias en la expresión génica entre los grupos de respondedores y progresores se evaluaron utilizando la

prueba t para datos no apareados cuando se cumplió la suposición de normalidad. Los resultados siempre mostrados en esta tesis son el promedio +/- SEM (error estándar de la media).

Tabla 2

REACTIVO	PROVEEDOR/ BIBLIOGRAFÍA	IDENTIFICADOR
ANTICUERPOS		
CD8 α -APCCy7 (53-6,7)	Biologend	Cat#100714
TCR- β -PE (H57-597)	Biologend	Cat#109208
CD19-PercPCy5.5 (ID3)	BD	Cat#551001
OVA-pentamer-APC	Proimmune	Cat#41045
TCR β 12-biotina (MR11-1)	BD	Cat#553299
CD11b-PercPCy5.5 (M1/70)	Biologend	Cat#101228
CD11c-PECy7 (HL3)	BD	Cat#558079
CD80-PE(16-10A1)	BD	Cat#553769
I-Ab/Class II (AF6-120.1)	BD	Cat#562012
Ly6G&C/Gr1-FITC (RB6-8C5)	Biologend	Cat#108406
NK1.1 PercPCy5.5 (PK136)	BD	Cat#551114
B220/CD45R-PercPCy5.5 (RA3-6B2)	Biologend	Cat# 103236
CD3-PercPCy5.5 (100328)	Biologend	Cat#100328
RORgt-PE	Invitrogen	Cat#12-6981-82
CD4-Pacific Blue (GK1.5)	Biologend	Cat#10428
CD64-Brilliant Violet 605 (X54-5/7,1)	Biogend	Cat#139323
CD86-FITC (GL1)	INVITROGEN	Cat#11-0862-82
CD172 α /SIRP α -Alexa Fluor 488 (P84)	Biologen	Cat# 144024
IL-17-Alexa 647 (TC11-18H10)	BD	Cat#560184
ROR-gt-PE (AFJS-9)	INVITROGEN	Cat#12-6981-82
XCR1-APCCy7 (ZET)	Biologend	Cat#148224
Streptavidin-Alexa Fluor 568	Molecular Probes	Cat# S11226
DAPI	Life Technologies	Cat#D1306

REACTIVO	PROVEEDOR/ BIBLIOGRAFÍA	IDENTIFICADOR
Productos químicos, Péptidos, y Proteínas recombinantes		
Collagenase D	Roche- Merck	Cat# 11 088 858 001
OVA soluble (endogradeOvalbumin)	LIONEX, Diagnostics and Therapeutics	Cat# LET0027
Péptido OVA-I (H-2Kb-restricted OVA MHC class I epitope) (257-264; SIINFEKL)	InvivoGen	Cat# vac-sin
Péptido OVA-II (I-A(d) restricted OVA MHC class II epitope) (323-339; SIINFEKL)	InvivoGen	Cat# vac-isq
CPRG (Chlorophenol red- β -D- galactopyranoside)	Roche- Merck	Cat# 10884308001
HEPES	INVITROGEN	Cat#15630080
Piruvato de sodio	INVITROGEN	Cat#11360070
MEM-aminoácidos no esenciales	INVITROGEN	Cat#11140050
β -mercaptoetanol	Merck	Cat#M6250
Penicilina/Estreptomina	INVITROGEN	Cat#15140122
Geneticina (G418 sulfato)	INVITROGEN	Cat#11811031
L-glutamina	INVITROGEN	Cat#25030081
medio RPMI 1640 GlutaMAX	INVITROGEN	Cat# 61870010
Suero Fetal Bovino	INVITROGEN	Cat# 10270106
GM-CSF	Sobrenadante de cultivo de células COS transfectadas con GM-CSF murino	N/A
Prolong Gold Antifade Mountant	INVITROGEN	Cat#P10144
Anticuerpo anti-caspasa-1	Adipogen	AG-20B-0042
Quitosano (Protasan UP CL 113 ultrapure chitosan hydrochloride)	Novamatrix	N/A
6-coumarin	Sigma Aldrich	Cat # 12779
Lecitina de soja	LIPOID	Cat# 579000
Crodamol (caprylic and capric fatty acid neutral oil)	Croda	Cat# GE06664
Poloxamer 188 (polímero de PEG)	Sigma Aldrich	Cat#K4894

REACTIVO	PROVEEDOR/ BIBLIOGRAFÍA	IDENTIFICADOR
PMA (éster de forbol)	Sigma-Aldrich	Cat# P 1585
Ionomicina (activador de NFAT)	Sigma-Aldrich	Cat# I3909
Brefeldina A	Biolegend	Cat # 420601
IL-1 β	R&D Systems	Cat # 401-ML-025
IL6	R&D Systems	Cat # 406-ML-025
IL-23	R&D Systems	Cat # 1887-ML-010
IL-2	R&D Systems	Cat # 402-ML-020/CF
anti-IFN γ	R&D Systems	Cat# MAB4851-SP
DDAO-SE	Thermo Fisher	Cat# C34564
Anticuerpo policlonal anti-TMEM176B	Proteintech	Cat# 19825-1-AP
Control goat IgG	R&D Systems	Cat# AB-108-C
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 Escherichia coli 0111:B4	Sigma	Cat# L4391
(+)-BayK8644	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-364594 CAS: 98791-67-4
FLICA 660 Caspase-1 Assay (FLICA1)	Immunochemistry	Cat# 9122
Ensayos comerciales		
Kit ELISA IL-1 β ratón	Biolegend	Cat# 432603
CD11c MicroBeads UltraPure, mouse	Miltenyi Biotec Inc	Cat# 130-108-338
CD4 MicroBeads UltraPure, mouse	Miltenyi Biotec Inc	Cat# 130-117-043

REACTIVO	PROVEEDOR/ BIBLIOGRAFÍA	IDENTIFICADOR
Modelos experimentales: Líneas celulares		
E.G7-OVA	ATCC	Cat# CRL-2113 RRID:CVCL_3505
B3Z: Hibridoma célula T que expresa TCR específicos para péptido OVA (257–264) (SIINFEKL) en el contexto de H-2Kb.	Ignacio Cebrián del Laboratorio de Fusión de Membranas, IHEM-CONICET; Facultad de Ciencias Médicas, UNCuyo	N/A
Modelos experimentales: organismos/cepas		
Ratón: Tmem176b-1 ^{-/-}	Cristina Cuturi's lab	N/A
Ratón: Tmem176b ^{+/+}	Cristina Cuturi's lab	N/A
Ratón: C57BL/6J	The Jackson Laboratory	Cat# 000664 RRID:IMSR_JAX:000664
Ratón: OT-II	The Jackson Laboratory	Cat# B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J
Oligonucleótidos		
Primers for RORyt (mRNA)	Segovia <i>et al.</i> , 2019	N/A
Primers for <i>Ifny</i>	Segovia <i>et al.</i> , 2019	N/A
Primers for <i>Foxp3</i>	Segovia <i>et al.</i> , 2019	N/A
Primers for <i>Tgfβ</i>	Segovia <i>et al.</i> , 2019	N/A
Primers for <i>Ido-1</i>	Segovia <i>et al.</i> , 2019	N/A
Primers for <i>Ctla4</i>	Segovia <i>et al.</i> , 2019	N/A
Primers for <i>Il4</i>	Segovia <i>et al.</i> , 2019	N/A
Primers for <i>Gata3</i>	Segovia <i>et al.</i> , 2019	N/A
Primers for <i>Gapdh</i>	Segovia <i>et al.</i> , 2019	N/A
Programas		
FlowJo vX.0.7	Flowjo, LLC	N/A
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc.	N/A
Fiji image processing package	ImageJ v.1.5	N/A

Resultados

▪ Parte I

● ***El BayK8644 libre inhibe la presentación cruzada de antígeno por las DCs esplénicas in vitro.***

La generación de linfocitos T citotóxicos contra antígenos exógenos requiere de la presentación de los mismos por las moléculas del MHC I, lo que se denomina: "Presentación Cruzada de antígenos"⁹. Nuestro grupo ha reportado que Tmem176b regula el pH fagosomal en BMDCs y de esa manera controla el procesamiento de antígenos exógenos para ser cargados en el MHC de clase I (vía de la presentación cruzada)⁹⁷. En este trabajo nos propusimos primero evaluar nuestra hipótesis en la cual planteamos que al inhibir la proteína Tmem176b con el compuesto BayK8644 se inhibiría la vía de la presentación cruzada de antígenos. Para estudiar ese aspecto, cultivamos DCs derivadas de bazo de animales naive C57BL/6, previamente purificadas con perlas magnéticas anti-CD11c (detallado en Materiales y Métodos), y luego incubadas con medio de cultivo (NT), con la proteína OVA soluble ó con OVA más BayK8644 (10 ó 20 μ M) durante 4 horas. Sabemos por bibliografía que las cCD1 esplénicas son eficientes en realizar la presentación cruzada de antígenos y así logran estimular las células T citotóxicas CD8⁺^{69,65}. Las DCs se cultivaron *in vitro* con el hibridoma T CD8⁺ B3Z, el cual contiene la enzima β -Gal bajo el control del promotor de la IL-2 y la expresa por estimulación con el complejo H2-Kb-SIINFEKL. La capacidad de las DCs de realizar la presentación cruzada de antígenos se determinó por la actividad de la enzima LacZ. Cómo se observa en la Figura 1, la proteína OVA soluble fue capaz de inducir una activación dosis-dependiente en las células B3Z (Figura 1), y aumentó significativamente la actividad LacZ en comparación con el control NT. El BayK8644 libre a una concentración de 10 μ M no afectó la activación de las células B3Z en comparación con la proteína OVA soluble. Por el contrario el BayK8644 libre a una concentración de 20 μ M provocó una disminución estadísticamente significativa de la actividad LacZ, lo que revela la disminución del proceso de presentación cruzada

de antígenos en células CD11c⁺ esplénicas (Figura 1 B). Este resultado también fue obtenido utilizando 50 μ M de BayK8644 (Figura 1 C). Ha sido reportado que las células B3Z son capaces de activarse en ausencia de señales de coestimulación ²¹⁷. Parece poco probable entonces que la disminución de la activación de B3Z se deba a alteraciones como el fenotipo de las DCs inducido potencialmente por el BayK8644. El efecto del BayK8644 sobre la activación de las células B3Z podría deberse entonces a una modulación del compuesto sobre el procesamiento de la OVA. Para evaluar esa interpretación, cargamos a las DCs con el péptido de la proteína OVA, SIINFEKL (OVA257-264) a concentraciones de 0.1, 0.5, 1.0 y 10 ng/mL (Figura 1 D). Este péptido se une a las moléculas de MHC clase I H2kb y es el mínimo péptido reconocido por el TCR de las células B3Z. Es entonces un antígeno que no requiere procesamiento por parte de las DCs para estimular células B3Z. Observamos que el BayK8644 libre no afecta la presentación del péptido SIINFEKL en las moléculas de MHC-I.

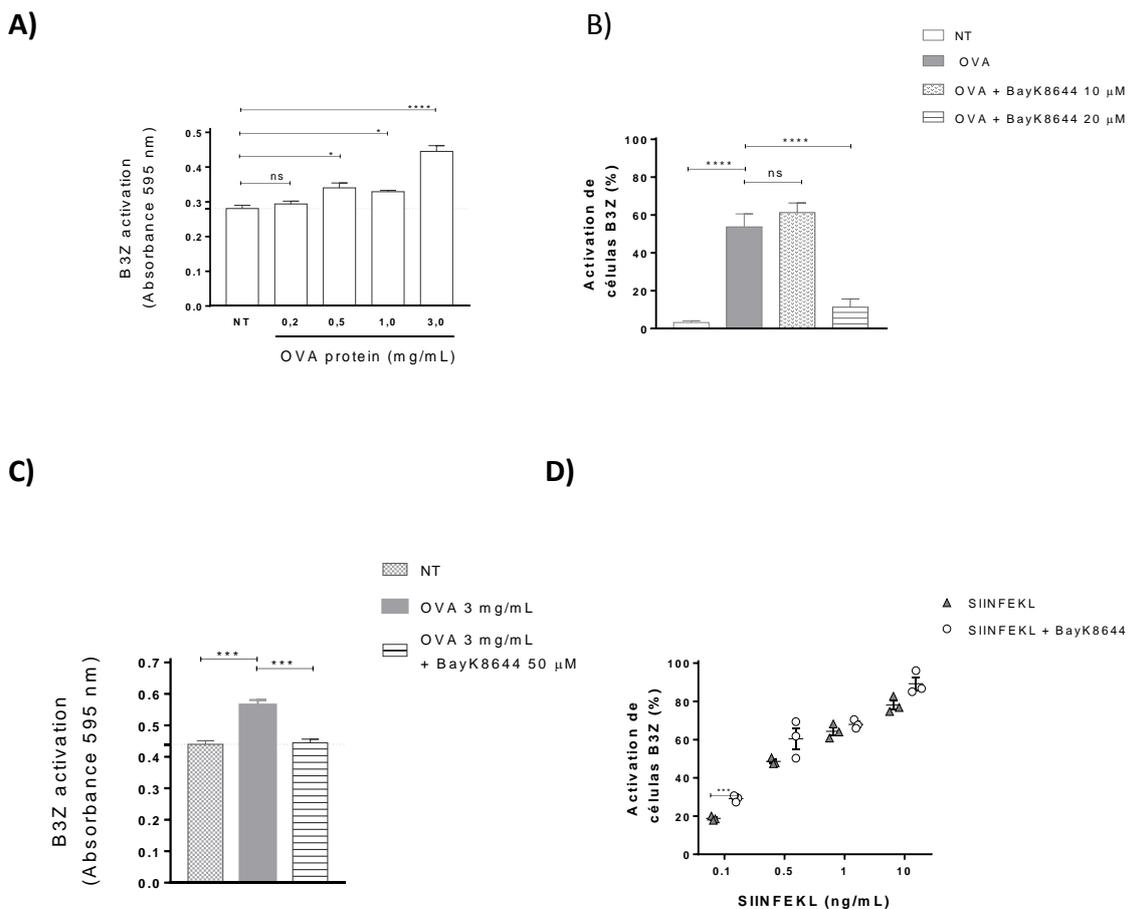


Figura 1. BayK8644 libre inhibe la presentación cruzada en células dendríticas CD11c⁺. Se evaluó por espectrofluorímetro la activación de la línea celular B3Z al reconocer el péptido SIINKEKL vía MHC-I. Las DCs esplénicas CD11c⁺ se estimularon con la proteína OVA (a diferentes concentraciones) n=1 **(A)**, con OVA (3 mg/ml) más BayK8644 libre (10 ó 20 μ M; n=4) **(B)**; ó con OVA (3 mg/ml) más BayK8644 libre 50 μ M (n=1) **(C)** ó con el péptido SIINFEKL en diferentes concentraciones más 20 μ M BayK8644 libre; n=3 **(D)**. *P <0.05 **P< 0.01 ***P< 0.001 ****P <0.0001. Test estadísticos: ANOVA de una vía **(A y B)** y test de Student no pareado **(C y D)**.

Como esperábamos, con este resultado podemos concluir que el BayK8644 libre fue capaz de inhibir el procesamiento de antígenos en la vía de la presentación cruzada, lo que conlleva a formular que el BayK8644 podría estar limitando la generación de linfocitos T CD8⁺ específicos de antígenos tumorales.

- ***Encapsulación del BayK8644 en nanopartículas de quitosano.***

La generación de linfocitos T CD8⁺ específicos de antígenos tumorales es fundamental en la respuesta desencadenada contra el tumor²¹⁸. Para promover la generación de esta subpoblación de células T CD8⁺ al mismo tiempo que intentar evitar inhibir la presentación cruzada de antígenos diseñamos junto al grupo de los Dres. Helena Pardo y Álvaro Mombrú (Facultad de Química y Polo Tecnológico de Pando, UdelAR) partículas de quitosano que logran encapsular al BayK8644 (NP-BayK8644). La liberación retardada de BayK8644 al estar encapsulado podría en teoría evitar la inhibición de la presentación cruzada⁹⁸. Se sabe que el procesamiento de antígenos a través de la vía de la presentación cruzada requiere una cinética rápida⁹⁸. La tasa de liberación de antígenos en los endofagosomas afecta directamente la eficiencia de la presentación cruzada, con un límite de tiempo aparente de 25 minutos después de la internalización para que la liberación de antígenos sea productiva. En ese sentido, el pH fagosomal alcalinizado transitoriamente durante los primeros 30 minutos después de la fagocitosis se asoció con una presentación cruzada deficiente en las DCs

Tmem176b^{-/-}⁹⁷. Por lo tanto, razonamos que la formulación de BayK8644 a través de un mecanismo de liberación lenta en el compartimento endosómico podría evitar la inhibición de la presentación cruzada por el compuesto. Las nanopartículas de quitosano (NP) se han caracterizado como estrategias de encapsulación de fármacos que liberan compuestos con una cinética lenta. Por lo tanto, especulamos que la encapsulación de BayK8644 en NP de quitosano podría evitar la inhibición de la presentación cruzada por el compuesto, manteniendo probablemente su capacidad de activación del inflammasoma.

Cómo se observa en la **Tabla 1**, fueron sintetizadas NPs de quitosano (polisacárido lineal semicristalino compuesto por unidades de N-acetil D-glucosamina y D-glucosamina unidos mediante enlaces glucosídicos β (1-4)), y recubiertas en su superficie con polietilenglicol (PEG), el cual forma una capa hidrofílica protectora alrededor de las nanopartículas¹⁸⁶. Se realizaron síntesis de NPs que contenían al compuesto (+)-BayK8644 (PM 356.3 g/mol) ó a la sonda fluorescente 6-coumarin (PM 350.4 g/mol). Esta última nos permitió realizar experimentos de seguimiento ó rastreo de las NPs *in vitro*. El tamaño promedio, el índice de polidispersidad (IP) y el potencial Z de las nanopartículas de csNP, csNP-PEG, csNP-PEG-BayK8644 y csNP-PEG-6cou, se detallan en la **Tabla 1** así como también la eficiencia de encapsulación de la formulación que contiene BayK8644.

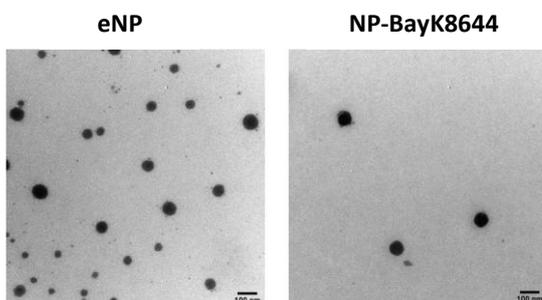
Tabla 1 Propiedades físico-químicas de las nanopartículas obtenidas (media \pm DS; n = 3)

Tipo de nanosistemas	Tamaño \pm DS (nm)	PDI \pm DS	Zeta potencial \pm DS (mV)	Eficiencia encapsulación (%)
NP	180.7 \pm 15.0	0.249 \pm 0.075	27.8 \pm 1.3	
NP-PEG	173.4 \pm 4.1	0.218 \pm 0.020	25.9 \pm 5.7	
NP-PEG-BayK8644	209.9 \pm 11.9	0.198 \pm 0.032	24.6 \pm 2.2	99.8 \pm 0.1
NP-PEG-6coumarin	199.1 \pm 2.65	0.228 \pm 0.006	24.2 \pm 1.0	

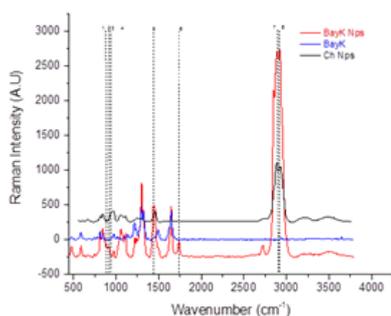
El tamaño de las csNP obtenido mediante la utilización de un Nano Zetasizer, fue en promedio cercano a 200 nm, el cual se encuentra dentro del rango de tamaños óptimos para mejora el tiempo de circulación de las NPs en los fluidos biológicos, así

como también para su internalización celular ²¹⁹. Además podemos concluir que las soluciones coloidales obtenidas son estables, ya que su potencial Z es menor a 30 mV. La eficiencia de encapsulación del compuesto BayK8644 en todas las síntesis realizadas, siempre fue mayor a 99%.

A)



B)



C)

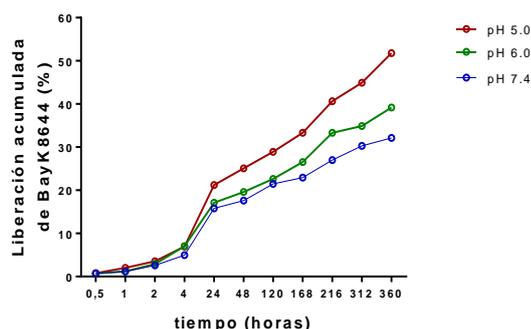


Figura 2. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de quitosano (NPs). **A)** Imagen de micrografía electrónica de transmisión (TEM) que muestra la morfología esférica y el diámetro físico de las NPs. Los tamaños de las NPs son uniformes y revelan la distribución conservada. **B)** Espectro Raman de NP-BayK8644 (en rojo, BayKNps), BayK8644 libre (azul) y eNP vacías (negro, ChNps). **C)** Perfiles acumulativos de liberación de BayK8644 encapsulado en NPs que varían en diferentes condiciones de pH. Las NP-BayK8644 mostraron un perfil de liberación de BayK8644 dependiente del pH. La solución de NP-BayK se disolvió en PBS o buffer acetato a los valores indicados de pH (pH 5.0, pH 6.0 y pH 7.4). La cantidad de BayK8644 libre liberada se determinó mediante HPLC a diferentes tiempos..

En la Figura 2 A, se observa en las imágenes de TEM de las NP-BayK8644 y eNP su forma esférica y una distribución de tamaño homogénea. Los tamaños obtenidos por TEM son menores que los obtenidos por Nano Zetasizer **Tabla 1**. Esta diferencia en la medida de tamaño surge porque en solución los iones de carga opuesta serán atraídos a la superficie de las nanopartículas generando capas iónicas que se mueven junto con ella, y el Nano Zetasizer mide el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas en solución, mientras que el TEM informa el diámetro real de las nanopartículas sin la capa iónica²²⁰.

El estudio por microscopía Raman confocal (Figura 2 B) nos permitió evaluar los posibles grupos funcionales involucrados en la formación de las nanopartículas de quitosano. Como se desprende de la comparación de los distintos espectros Raman obtenidos, existen diferencias notorias entre los espectros del BayK8644 libre y el de las NPs de quitosano vacías con respecto del obtenido con las NPs de quitosano cargadas con BayK8644, obteniéndose un espectro distinto al que se hubiera obtenido únicamente adicionando los espectros individuales. El modo vibracional del grupo amino del quitosano (NH₂) se encuentra aproximadamente en la región 3300 cm⁻¹²²¹, mientras que las bandas características de los modos vibracionales del fosfato se encuentran en la región de 1250 y 1080 cm⁻¹ para el estiramiento antisimétrico y simétrico del PO₄²⁻ respectivamente^{222,223}. Por lo tanto, el espectro Raman de las nanopartículas de quitosano nos permite inferir que los grupos fosfatos (PO₄³⁻) de la lecitina de soja y el grupo amino (NH₂) del quitosano podrían ser los grupos funcionales involucrados en su formación. Pues, se observan diferencias en los picos previamente mencionados de los espectros de lecitina y quitosano con respecto al espectro Raman de las nanopartículas. Esto indica que se tiene que haber dado una interacción química entre los materiales constituyentes de las NPs y la molécula del BayK8644, lo que resulta importante a la hora de obtener una adecuada liberación de la molécula del BayK8644, la cual se daría a partir de la fase lipídica al irse degradando la pared de quitosano.

A la hora de seleccionar la mejor formulación de las NPs de quitosano, se consideró que los compuestos (quitosano, lecitina de soja, Crodamol) que conforman la NP permitieran la mayor liberación del BayK8644 a pH ácidos, menores a 7.4. Esto representaría el pH del interior de endosoma, dónde deseamos que el BayK8644 interaccione con TMEM176B. Los datos obtenidos de la liberación *in vitro* del BayK8644 de la NP de quitosano se muestra en la Figura 2 C. Se determinó la liberación en PBS (pH 7.4 y 6.0) o buffer acetato (pH 5) a intervalos predeterminados de tiempos, a una temperatura de 37 °C. La liberación en el medio ácido (pH 5.0 y 6.0) fue levemente mayor a las 4 horas de incubación, cuando comparada con el pH neutro de 7.4. Sin embargo a las 24 horas de incubación, existió una diferencia mayor en la liberación del BayK8644 a pH de 5.0, comparados con los pH de 6.0 y 7.4. Cómo se observa en la gráfica, en todos los tiempos testeados (mayores a 0.5 horas) siempre se obtuvo mayor liberación del compuesto BayK8644 a pH igual a 5.0.

Así, la encapsulación de BayK8644 en NPs de quitosano es altamente eficiente, generó NPs con características fisicoquímicas compatibles con su uso con células y libera el compuesto con una cinética lenta.

● ***Las nanopartículas de quitosano no inhibien la presentación cruzada de antígenos y promueven la activación del inflammasoma NLRP3.***

Para determinar si la encapsulación de BayK8644 en NPs de quitosano puede mejorar las propiedades antitumorales del compuesto, estudiamos si las NP-BayK8644 modulan la biología de las DCs y de qué manera. Así, luego de sintetizar las NPs de quitosano con las características de tamaño y potencial Z deseadas, evaluamos si las NPs serían reconocidas y endocitadas por las BMDCs, proceso requerido para que las NPs alcancen el endosoma. Como se observa en la Figura 3 A, aproximadamente un 18 % de las BMDCs fueron capaces de endocitar las NPs que contienen la sonda fluorescente 6-coumarin, al ser éstas incubadas a una temperatura de 37°C. El tratamiento a una temperatura de 0°C de las BMDCs con NP-6cou se utilizó como

control negativo, el cual se muestra en la gráfica en color celeste. En la Figura 3 B, se puede observar la cuantificación mediante citometría de flujo de las células 6-coumarin positivas. El porcentaje de células 6-coumarin positivas fue significativamente mayor cuando las BMDCs fueron tratadas a 37 °C, comparado con el tratamiento a 0 °C. También se determinó la Intensidad de fluorescencia media (MFI) de ambos tratamientos, y como se muestra en la Figura 3 C las MFI de 6-coumarin en las BMDCs tratadas a 37 °C fue significativamente mayor que el tratamiento a 0 °C.

Para evaluar la localización intracelular de las NP cargadas con 6 coumarin a las células dendríticas, se realizó microscopía (Figura 3 D) de los cultivos tratados a diferentes temperaturas. Se puede observar que las BMDCs tratadas a 37 °C fueron capaces de internalizar las NP-6cou, ya que se observó emisión de fluorescencia proveniente de la sonda 6-coumarin (mostrada en verde) en el interior celular. Por el contrario, en el tratamiento a 0 °C la fluorescencia de las NP-6cou se observa del lado externo de la membrana plasmática. En resumen se concluye que en nuestro modelo las NP cargadas con la sonda 6-coumarin fueron internalizadas por las BMDCs tratadas a una temperatura de 37 °C probablemente a través del proceso de endocitosis.

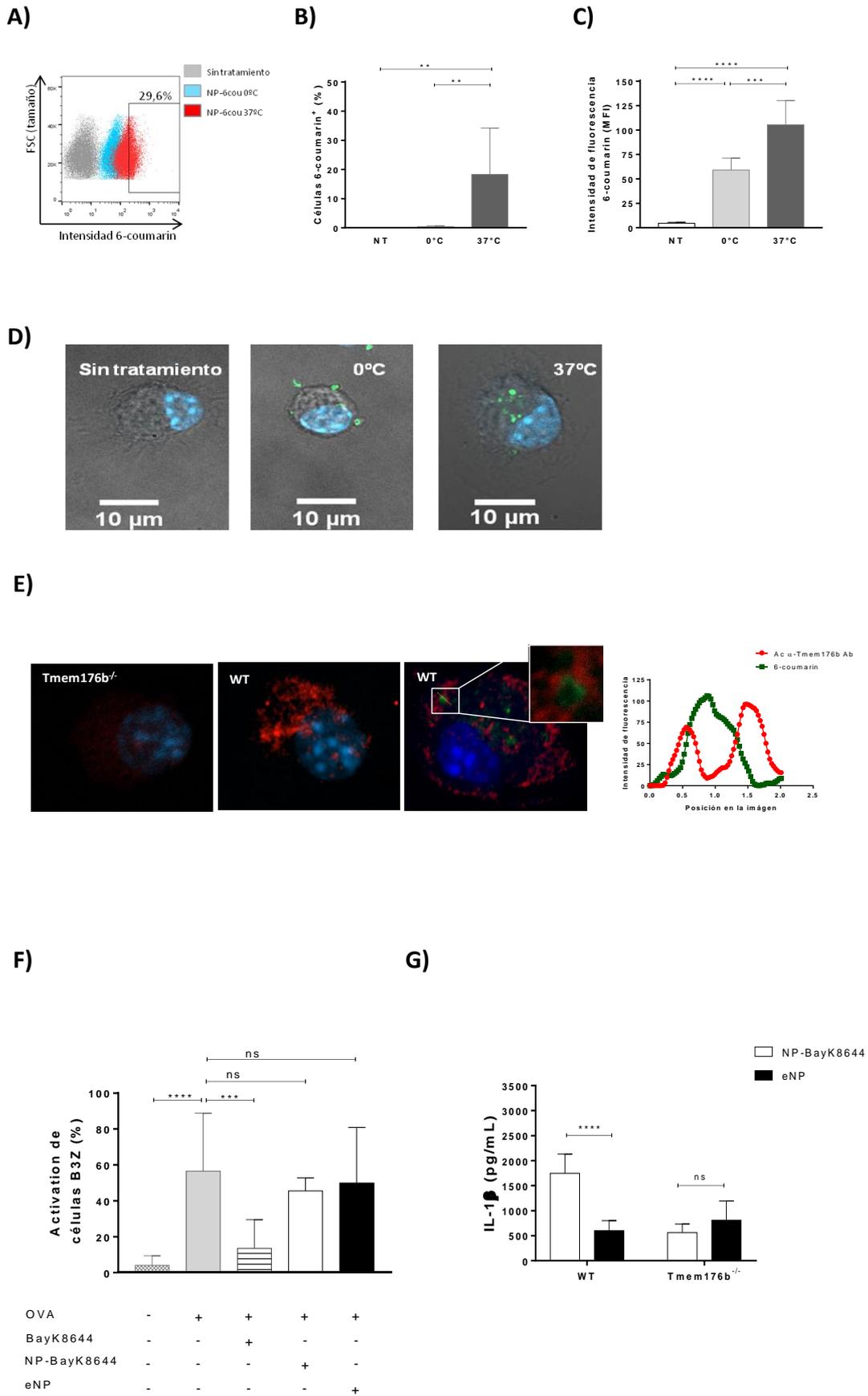
Como se mencionó anteriormente, un objetivo de este trabajo fue inhibir a la proteína TMEM176B con el compuesto BayK8644 encapsulado en NPs, sin afectar la presentación cruzada de antígenos. Para lograr dicha inhibición el compuesto BayK8644 debe alcanzar el endosoma, compartimiento intracelular donde se localiza TMEM176B. Nos propusimos demostrar que las NPs co-localizaban con la proteína TMEM176B, mediante microscopía confocal. En la Figura 3 E, en la imagen central se observa la marcación intracelular con un patrón puntillado de la proteína TMEM176B, en rojo, y el núcleo en azul marcado con DAPI. La marcación de TMEM176B fue realizada también en células *Tmem176b^{-/-}*, para corroborar la ausencia de marcado de TMEM176B; ambas imágenes fueron tomadas utilizando las mismas condiciones de ajuste del microscopio confocal. En la imagen de la derecha, logramos demostrar la co-localización intracelular de las NP-6cou (fluorescencia mostrada en verde) con la proteína TMEM176B (fluorescencia mostrada en rojo), en la que BMDCs derivadas de

ratones *Tmem176b* (WT) fueron tratadas con NP-6coumarin por 30 minutos a 37 °C. El gráfico de la derecha muestra la representación de colocalización con los perfiles de intensidades del anticuerpo anti-TMEM176B y de la sonda 6-coumarin. Se observa que la intensidad de fluorescencia del anticuerpo anti-TMEM176B disminuye en la posición 0.5 de la imagen, y es en este punto que aumenta la fluorescencia de la sonda 6-coumarin. Este comportamiento de las intensidades se mantiene hasta al punto 1.5 de la imagen, en el cual se invierten ambas intensidades. Este resultado sugiere que las NPs serían internalizadas por endosomas TMEM176B⁺ ⁹⁷. Así, el BayK8644 liberado por las NPs dentro de los endosomas estará en proximidad con la proteína TMEM176B.

Una vez caracterizadas las NPs de quitosano, en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas y al proceso de endocitosis mediada por las DCs, donde fue demostrado que son endocitadas por las BMDCs, sumado al resultado dónde fue demostrada la capacidad del BayK8644 libre de inhibir la presentación cruzada, evaluamos si el BayK8644 encapsulado en nanopartículas de quitosano protegería la inhibición de la presentación cruzada de antígenos. Como se observa en la Figura 3 F, el tratamiento de células dendríticas CD11c⁺, derivadas del bazo de animales C57BL/6, en presencia de 3mg/mL de la proteína OVA soluble ocurrió la presentación del péptido OVA, demostrado por un incremento significativo en la respuesta de las células B3Z en comparación a las células no tratadas. El BayK8644 libre (20 µM) fue capaz de inhibir la presentación cruzada del péptido OVA, como ya fue mostrado en la Figura 1 B. Por el contrario el tratamiento de BayK8644 encapsulado en NPs de quitosano más la proteína OVA no afectó la presentación antigénica a los linfocitos T CD8⁺, comparada con las células tratadas solamente con OVA soluble. Asimismo se observa en la Figura 3 F que las NPs vacías (eNP) tampoco modulan la presentación cruzada del péptido OVA, si se compara este tratamiento con el de OVA soluble solamente. En conjunto, estos resultados indican que si bien el BayK8644 libre inhibió la presentación cruzada de antígenos en nuestro modelo de trabajo, logramos revertir dicha inhibición al encapsular el BayK8644 en nanopartículas de quitosano. Este tratamiento permitiría la presentación antigénica de las células dendríticas a las células T CD8⁺ citotóxicas, específicas de antígenos tumorales. A través de esta

estrategia de formulación del BayK8644 se podría entonces mejorar el efecto anti-tumoral del compuesto, mediado por células T CD8⁺ citotóxicas en relación al BayK8644 libre.

Nuestro próximo objetivo fue demostrar que el BayK8644 encapsulado en NPs de quitosano también era capaz de activar el inflamasoma en BMDCs derivadas de animales WT y *Tmem176b*^{-/-}. Como se observa en la Figura 3 G, fue evaluada la liberación de IL-1 β en el sobrenadante de cultivo de BMDCs derivadas de animales WT y que fueron tratadas con NP-BayK8644 ó NPs vacías (eNP). El tratamiento con NP-BayK8644 indujo un aumento en la liberación de IL-1 β significativamente mayor que el tratamiento con eNP, en BMDCs derivadas de animales WT. Por el contrario no existió diferencia significativa al cuantificar la liberación de IL-1 β , entre ambos tratamientos, en BMDCs derivadas de animales *Tmem176b*^{-/-}. En la Figura 3 H, se analizó también la síntesis de IL-1 β en el sobrenadante de cultivo de BMDCs derivadas de animales WT, que fueron estimuladas con NP-BayK8644, NPs vacías (eNP) ó BayK8644 libre. Se observó de forma preliminar que el tratamiento con las NP-BayK8644 estimularon de forma significativamente mayor la síntesis de IL-1 β comparado con el tratamiento con eNP ó BayK8644 libre.



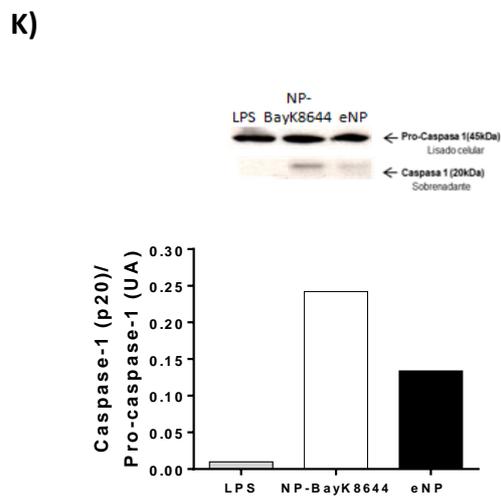
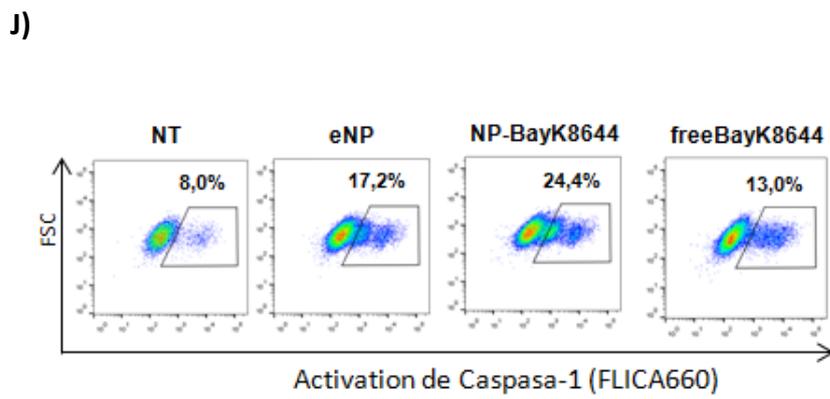
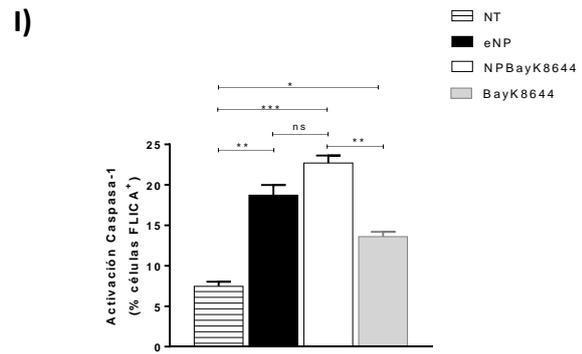
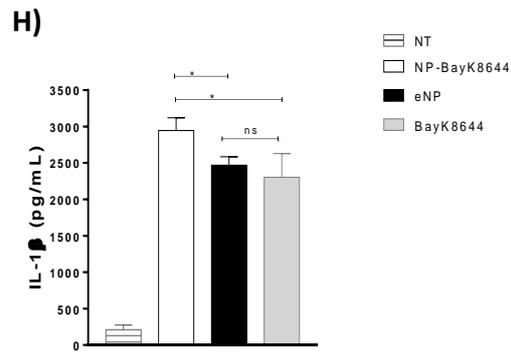


Figura 3. BayK8644 encapsulado en nanopartículas de quitosano no inhibe la presentación cruzada en células dendríticas CD11c⁺, sí induce activación del inflammasoma NLRP3. Las BMDCs fueron tratadas *in vitro* con 6-coumarin encapsulada en NPs (NP-6cou) por 30 minutos, a 37 ° C, temperatura que permitió el proceso de endocitosis; y a 0°C como control negativo de la endocitosis. La intensidad del 6-coumarin se midió en un citómetro de flujo CyAn ADP, equipado con un láser de 488 nm y un filtro de banda de 530/40 nm. **A)** Gráfico de puntos representativo que muestra el porcentaje de células positivas para 6-coumarin de BMDC tratadas con NP-6cou a 37 ° C (puntos rojos), en comparación con las BMDCs tratadas con NP-6cou a 0 ° C (puntos celeste). Los puntos grises representan BMDC no tratadas. **B)** Porcentaje de células 6-coumarin positivas (se muestran tres experimentos independientes, ** p <0.01; ANOVA de una vía); y la intensidad de fluorescencia media (MFI) del 6-coumarin **(C)** determinada por citometría de flujo; *** p <0.001; **** p <0.0001. ANOVA de una vía (B y C, n=3). **D)** Cortes confocales obtenidos por microscopía confocal, de BMDCs tratadas con NP-6cou a las temperaturas indicadas (0 ° C y 37 ° C). Las imágenes muestran la localización celular de las NP. Las NP-6cou marcadas en verde y en azul se observan los núcleos (tinción con DAPI). Barras de escala, 10 µm. n=3. **E)** Microscopía confocal que muestra la colocalización de las NP-6cou y la proteína TMEM176b. Se trataron BMDCs de ratones Tmem176b (WT) y ratones Tmem176b^{-/-} con NP-6cou durante 30 minutos, luego se realizó la tinción con anticuerpo anti-TMEM176B (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). El gráfico de la derecha muestra la representación de la colocalización mediante los perfiles de intensidad del anticuerpo anti-TMEM176B (rojo) y los NP de 6-coumarina (verde) obtenidos utilizando el software ImageJ, a lo largo de una línea recta (en amarillo) trazada en la imagen de microscopía, dentro del cuadrado blanco. Las intensidades de fluorescencia se representan a lo largo del eje y y la posición de la imagen a lo largo del eje x. **F)** Se evaluó la presentación cruzada de OVA, OVA más 20 µM de BayK8644 libre, OVA más NP-BayK8644 u OVA más eNP, por esplenocitos CD11c⁺ utilizando el hibridoma de células T, B3Z. Las DCs se estimularon con OVA soluble u OVA más el estímulo indicado durante 4 horas. Las DCs se cultivaron durante 18 hs con las células T B3Z. Se muestran tres experimentos independientes, *** p <0,001, **** p <0,0001. Prueba ANOVA de una vía. La activación del inflammasoma fue determinado mediante la cuantificación de IL-1 β en sobrenadantes de cultivos de BMDCs Tmem176b WT **(G y H)** y Tmem176b^{-/-} (G). Las BMDCs fueron tratadas con LPS (0,25 µg/mL) por 3 horas, lavadas y tratadas con 50 µM BayK8644 libre (H) ó encapsulado en NPs de quitosano (NP-BayK8644), o su cantidad equivalente de NPs vacías (eNP) (G). En G y H, se muestra un experimento representativo de 3 experimentos; ****p < 0.0001; two-way ANOVA test. En H se muestra un experimento *p <0.05.

I) La activación del inflamasoma fue determinada mediante la cuantificación por citometría de flujo de la Caspasa-1 activa. BMDCs derivadas de animales que expresan Tmem176b fueron estimuladas con 100 μ M de NP-BayK8644 ó la misma cantidad de eNP por 2 horas. La activación de Caspasa-1 activa fue determinada mediante la sonda FLICA (FLICA 660-VAD-FMK) por 30 minutos luego del estímulo con NPs y analizadas por citometría de flujo. Se muestra un experimento representativo de 5 experimentos * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; test de ANOVA de una vía **J)** Gráficos de puntos representativos de la cuantificación anterior por citometría de flujo. Se muestra el análisis en el cual se realizó previamente la exclusión de dobletes. **K)** Determinación mediante Western blot de la Caspasa-1 (en sobrenadante) y pro-Caspasa-1 (lisado celular) en BMDCs que expresan Tmem176b. Las BMDCs fueron estimuladas durante 3 horas con LPS (0.25 μ g/mL), lavadas y luego estimuladas con 50 μ M NP-BayK8644 ó su control eNP. Se muestra un experimento.

Fue evaluada también la activación de Caspasa-1 mediante citometría de flujo utilizando la sonda FLICA, cómo medida de la activación del inflamasoma en BMDCs derivadas de animales WT. En la Figura 3 I, queda demostrado el aumento, expresado en porcentaje, de células Flica⁺ cuando las BMDCs fueron tratadas con NP-BayK8644, comparado con el tratamiento con eNP o con el compuesto libre BayK8644. Las NP-BayK8644 así como las eNP poseen a través de su efecto particulado la capacidad de activar el inflamasoma. La Figura 3 J representa un gráfico de puntos mediante la técnica de citometría de flujo correspondiente a un experimento representativo que mostró que las BMDCs tratadas con eNP poseen 17 % de células Flica⁺, tratadas con NP-BayK8644 poseen un 24 % de células Flica⁺, y las tratadas con BayK8644 libre poseen un 13 % de células Flica⁺, dichos porcentajes fueron mayores al control sin tratamiento, que presentó un 8 % de células Flica⁺. La población celular mostrada en los gráficos de puntos, provienen del análisis de células viables y de la exclusión de dobletes, analizada en el detector de fluorescencia donde emite la sonda FLICA.

Los resultados mencionados anteriormente muestran que el tratamiento de BMDCs derivadas de animales WT con BayK8644 encapsulado en NP de quitosano fue capaz de activar el inflamasoma. Fue realizado también el estudio preliminar de la

expresión de Caspasa-1 mediante la técnica de Western Blot. Se observa en la Figura 3 K un aumento de la proteína Caspasa-1 en el sobrenadante de BMDCs tratadas con NP-BayK8644 comparada con la expresión de Caspasa-1 en el sobrenadante de las mismas células tratadas con eNP.

Así, la encapsulación del BayK8644 en NPs de quitosano protege la inhibición de la presentación cruzada mediada por el compuesto libre, así como también activa el inflammasoma .

● ***La administración terapéutica con BayK8644 encapsulado en NPs de quitosano aumenta la sobrevida y retarda el crecimiento tumoral en animales de una manera dependiente de Tmem176b.***

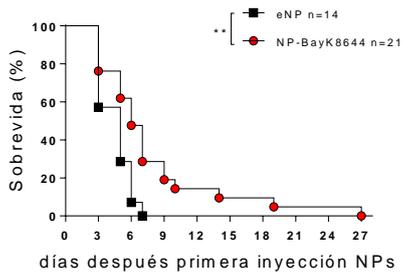
Mostramos que las NP-BayK8644 no inhiben la presentación cruzada de antígenos, así como también desencadenan la activación del inflammasoma. Hemos demostrado en un trabajo previo de nuestro grupo que el BayK8644 inyectado i.p antes del establecimiento del tumor controla el crecimiento tumoral (en un protocolo preventivo). Sin embargo, no obtuvimos control del crecimiento tumoral en animales con tumores establecidos (protocolo terapéutico)¹²⁰. Para evaluar el efecto del tratamiento terapéutico con NPBayK8644 fueron realizados estudios *in vivo* en animales WT. Como se observa en la Figura 4 A, los animales WT tratados con NP-BayK8644 tuvieron una sobrevida significativamente mayor que los animales tratados con NPs vacías (eNP). Sumado a esto, la administración terapéutica de NP-BayK8644 retrasó el crecimiento tumoral con respecto al tratamiento con eNP Figura 4 B. Así, aproximadamente un 14 % de los animales tratados con NP-BayK8644 logró mantener el tamaño tumoral hasta después del día 14 post-primera inyección de NP-BayK8644.

Luego de corroborar que el tratamiento con NP-BayK8644 prolongó la supervivencia de los animales WT, fue evaluado el efecto del mismo tratamiento en animales *Tmem176b*^{-/-}. Como se observa en la Figura 4 C, no hubo una diferencia significativa entre el tratamiento con NP-BayK8644 y eNP, las curvas de supervivencia de ambos tratamientos muestran un comportamiento similar. También fue determinado el tamaño tumoral en ambos tratamientos como muestra la Figura 4 D, el cual no presentó diferencias entre ambos grupos; el crecimiento tumoral tuvo un comportamiento cinético similar. Se puede concluir por tanto que las NP-BayK8644 controlan el crecimiento tumoral de una manera dependiente de *Tmem176b*.

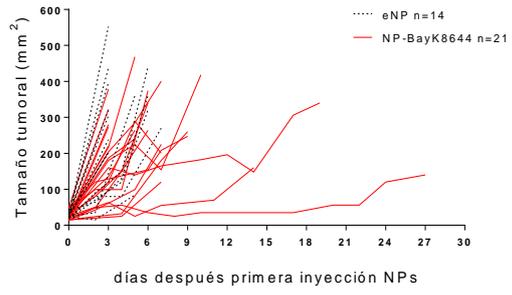
Luego evaluamos la supervivencia de animales WT tratados en un protocolo terapéutico con BayK8644 libre. Como se observa en la Figura 4 E, no hubo diferencia significativa en el tratamiento con BayK8644 libre comparado con su vehículo control. Las curvas de supervivencia y el crecimiento tumoral tuvieron un comportamiento similar Figura 4 E.

Para comprender mejor cómo el tratamiento con NP-BayK8644 puede controlar el crecimiento tumoral, evaluamos la activación del inflammasoma en TDLN de los animales tratados con NPBayK8644 o su control eNP. Previamente, habíamos reportado que la inyección de BayK8644 libre vía intra-peritoneal se asoció con una mayor activación de Caspasa-1 en DCs del TDLN y dicho tratamiento controló el crecimiento tumoral de una manera dependiente de Caspasa-1/11¹²⁰. Como se observa en la Figura 4 G, observamos en los TDLN de animales, que el tratamiento con NP-BayK8644 indujo un porcentaje mayor de DCs Caspasa-1⁺ comparado con el tratamiento con eNP. La Figura 4 H muestra los gráficos de punto del análisis anterior realizado por citometría de flujo. Estudios en curso están buscando determinar si el efecto anti-tumoral observado con el tratamiento con las NP-BayK8644 es efectivamente dependiente de activación del inflammasoma. Para esto pretendemos realizar ensayos *in vivo* de supervivencia con animales *Caspasa-1/11*^{-/-} tratados con NP-BayK. Esperamos ver que el efector protector se pierde en dichos animales.

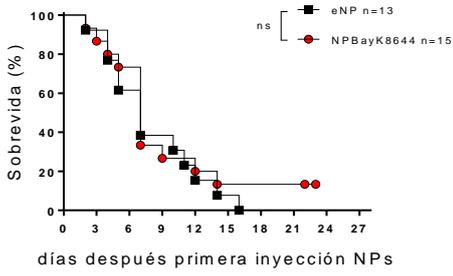
A)



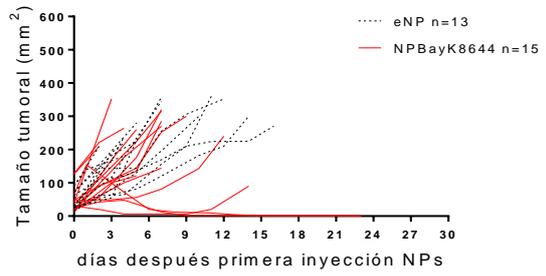
B)



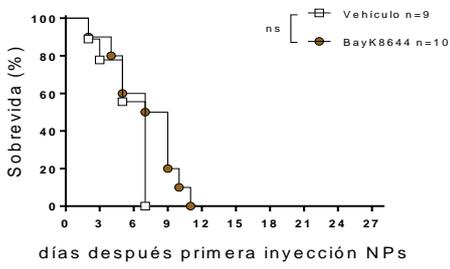
C)



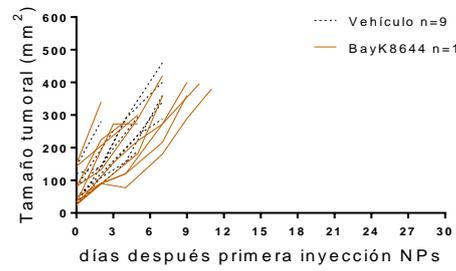
D)



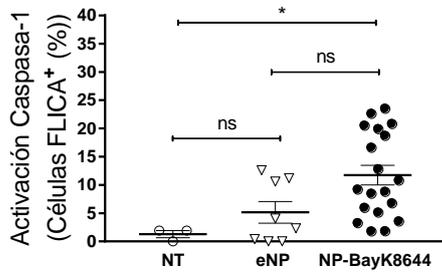
E)



F)



G)



H)

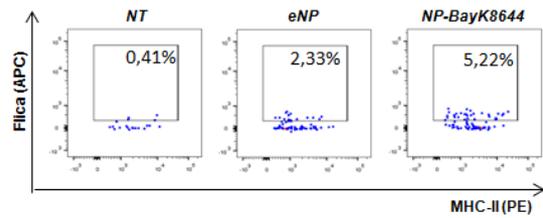


Figura 4. Los ratones tratados con BayK8644 encapsulado en nanopartículas de quitosano mostraron una mayor supervivencia y un retraso en el crecimiento tumoral en comparación con las nanopartículas vacías. Se inyectaron subcutáneamente ratones C57Bl6 WT **(A-B, E-F)** y *Tmem176b*^{-/-} **(C-D)** con $5,0 \times 10^5$ células de la línea EG7.OVA, linfoma tímico. 70 nanomoles de BayK8644 libre **(E-F)** ó BayK8644 encapsulado en NPs y el mismo volumen de NP vacías (eNP) **(A-D)** se inyectaron intra tumoralmente cada 2 días cuando el tamaño de los tumores alcanzó 5 mm en su diámetro más largo. Con un total de 5 inyecciones. El crecimiento del tumor y la supervivencia del animal se controlaron cada dos días y se midió en su diámetro más largo y más corto. Los ratones fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron $>200 \text{ mm}^2$ o cuando estaban ulcerados. ** $p = 0.005$ Prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox). **G)** Evaluación de Caspasa-1 en TDLN de animales que recibieron NP-BayK8644 ó eNP con el mismo protocolo que la figura A. Los TDLN fueron extraídos luego de la tercera inyección de NPs. Mediante citometría de flujo se determinó el porcentaje de DCs FLICA⁺. Las DCs fueron clasificadas por sus marcadores MHC-II⁺ y CD11c⁺, con previa exclusión de células T, B y NK. * $p < 0.05$ Prueba ANOVA una vía. **H)** Gráficos de punto de la cuantificación anterior. Las células mostradas con FLICA⁺, proviene de una región de DCs MHC-II⁺CD11c⁺, con un análisis previo de exclusión de dobletes y analizada dentro de la región de células viables .

● *La infiltración del microambiente tumoral por células T CD8⁺ totales y específicas de tumor se asocian con la capacidad de control tumoral en animales tratados con NP-BayK8644.*

Especulamos que el tratamiento con NP-BayK86644, además de su capacidad para desencadenar la activación del inflammasoma, podría mejorar la eficacia antitumoral al prevenir la inhibición de la presentación cruzada de antígenos por BayK8644. Las células T CD8⁺ antitumorales son activadas en los TDLN a través de la vía de presentación cruzada. Por lo tanto, estudiamos en TDLN la presencia de células T CD8⁺ mediante citometría de flujo en los animales portadores de tumores EG7.OVA tratados con NP-BayK8644, eNP ó BayK8644 libre. Como de observa en la Figura 5, el número de células T CD8⁺ totales (A) y específicas de tumor (Figura 5 B) en los TDLN de animales tratados con NP-BayK8644 presenta una tendencia a ser mayor que en los animales tratados con eNP ó BayK8644 libre, aunque no fue alcanzada la significancia estadística. Dichos animales recibieron 3 inyecciones de su respectivo tratamiento y se extrajeron los TDLN 24 horas luego de la tercera inyección para realizar el análisis de citometría de flujo. La misma tendencia fue observada al analizar el número de células T CD8⁺ totales y específicas contra el antígeno tumoral OVA en el microambiente tumoral (Figura 5 C y D, respectivamente), al comparar los tres grupos NP-BayK8644, eNP y BayK8644 libre.

Encontramos una correlación positiva estadísticamente significativa entre el tamaño tumoral y el número absoluto de células T CD8⁺ (Figura 5 E) y células T CD8⁺ específicas contra el antígeno tumoral OVA (Figura Figura 5 F) en el microambiente tumoral dentro de los animales tratados con NP-BayK8644.

Para estudiar la presencia de células T CD8⁺ en el TME en ratones tratados con NP-BayK8644, los animales fueron divididos en dos grupos, aquellos que respondían al tratamiento con NP-BayK8644, denominados “Respondedores” y los que no controlaron el crecimiento tumoral, denominados “Progresores” (en los respondedores al momento de la resección del tumor su tamaño tumoral era menor a 100 mm² y como progresores si tenían un tamaño mayor a 100 mm²).

En la Figura 6A, se muestra un aumento significativo en el porcentaje de células T CD8⁺ TCRβ⁺ (Figura 6 A y B) en los animales tratados con NP-BayK8644 que lograron responder al tratamiento, es decir aquellos animales que presentaron mayor sobrevida y un retraso en el crecimiento tumoral. La Figura 6 B representa un gráfico de puntos de un experimento representativo mostrando en los animales respondedores una mayor frecuencia relativa de células T CD8⁺TCRβ⁺ intratumorales en relación a los animales progresores. La población celular mostrada en los gráficos de puntos, provienen del análisis de células viables y de la exclusión de dobletes.

También fue demostrado un aumento significativo en el número absoluto de células T CD8⁺TCRβ⁺ en animales respondedores al tratamiento, ver Figura 6 C, en la cual el número de células T CD8⁺TCRβ⁺ se cuantificó por cada 1.0x10⁵ células tumorales.

En los animales respondedores se observó un aumento significativo en el número absoluto de células T CD8⁺ específicas para el antígeno que expresan las células tumorales administradas (EG7.OVA), evaluado a través de pentámeros de MHC-OVA (Figura 6 D). El número absoluto de células T CD8⁺TCRβ⁺ específicas para el antígeno OVA fue expresada por cada 1.0x10⁵ células tumorales. Así también se observó un aumento en el porcentaje de células T CD8⁺ específicas de antígeno tumoral (Figura 6 E) en animales respondedores al tratamiento con NP-BayK8644. La Figura 6 F muestra gráficos de puntos representativos de esos experimentos. La población celular mostrada en los gráficos de puntos, provienen del análisis de células viables y de la exclusión de dobletes.

El análisis de células T CD8⁺ en el TDLN y en el microambiente tumoral respalda el rol fundamental de preservar la presentación cruzada de antígenos con el tratamiento con NP-BayK8644 para mantener las propiedades antitumorales. Estudios en curso *in vivo* intentan demostrar directamente la importancia de las células T CD8⁺ en el efecto anti-tumoral de las NP-BayK8644 a través de la depleción de ese compartimento celular utilizando anticuerpos monoclonales.

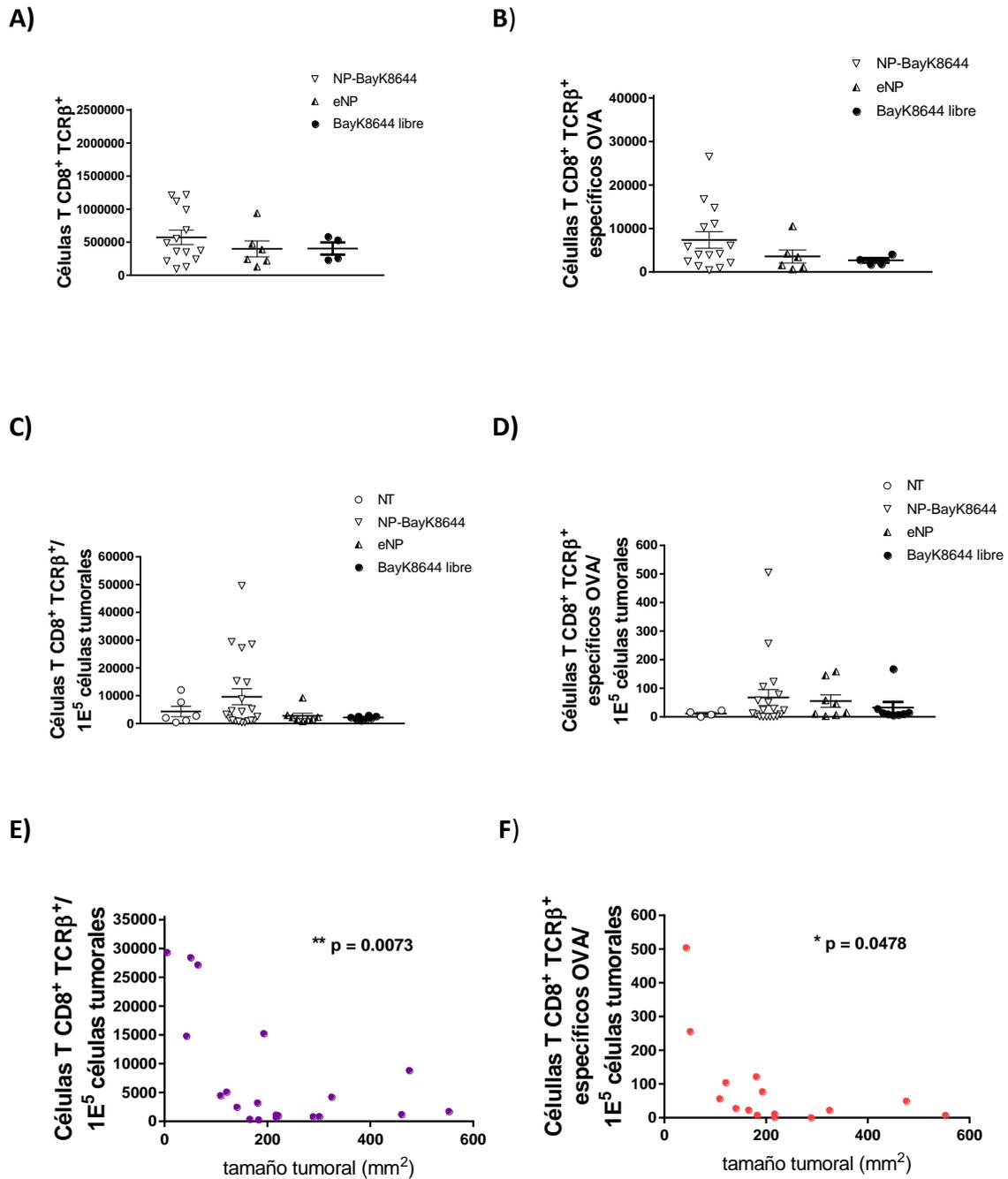
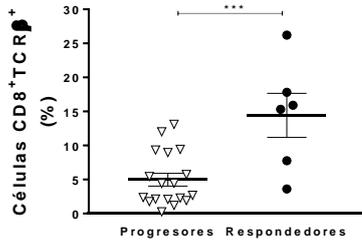
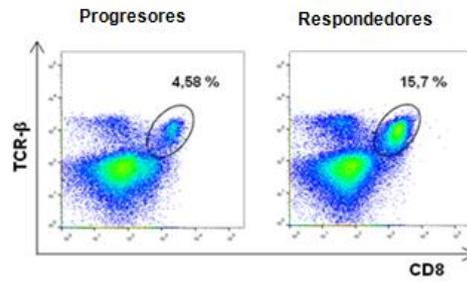


Figura 5. La infiltración del TME por células T CD8⁺ totales y específicas de tumor se asocian con la capacidad de control tumoral en animales tratados con NP-BayK8644. Se inyectaron con $5,0 \times 10^5$ células de la línea E.G7-OVA por vía subcutánea. Cuando el tumor alcanzó los 5 mm en su diámetro más largo se inyectó intratumoralmente NP-BayK8644 cada 2 días. 24 h después de la tercera inyección de NP-BayK8644 se realizó citometría de flujo para el análisis del número absoluto de células T CD8⁺TCRβ⁺ (A y C) en TDLN (A) y en TME (C). El número absoluto de células T CD8⁺TCRβ⁺específicas para OVA (B y D) en TDLN (B) y en TME (D). El número absoluto fue expresado por cada $1E^5$ células tumorales. E y F se muestra un análisis de correlación entre el tamaño tumoral y el número absoluto de células T CD8⁺TCRβ⁺ (E) y de células T CD8⁺TCRβ⁺específicas para OVA (F). * p <0,05; ** p <0,01.

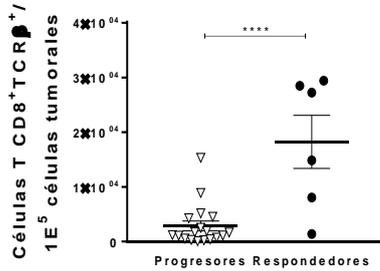
A)



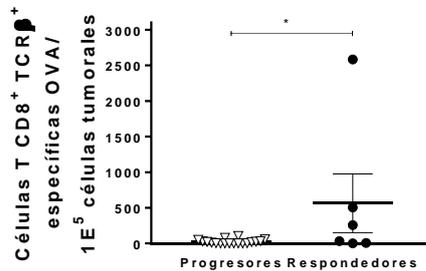
B)



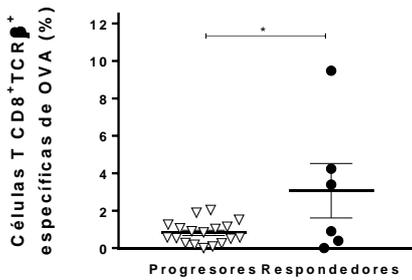
C)



D)



E)



F)

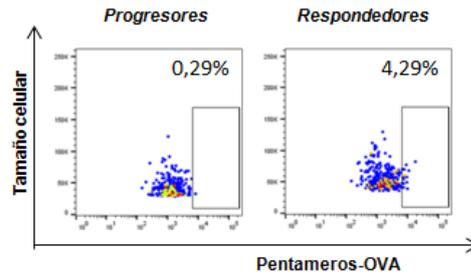


Figura 6. Los animales tratados con NP-BayK8644 respondedores al tratamiento desarrollan mayor respuesta en el TME vía células T CD8⁺ en comparación con los ratones progresores. Se inyectaron con 5×10^5 células de la línea E.G7-OVA por vía subcutánea. Cuando el tumor alcanzó los 5 mm en su diámetro más largo se inyectó intratumoralmente NP-BayK8644 cada 2 días. 24 h después de la tercera inyección de NP-BayK8644 se realizó citometría de flujo para el análisis del TME, frecuencia (A) y número absoluto (C) de células T CD8+TCRβ+ y frecuencia (E) y número absoluto (D) de células T CD8+TCRβ+específicas para OVA. El número absoluto fue expresado por cada $1E^5$ células tumorales. Se muestran gráficos de puntos representativos para la cuantificación de células T CD8+TCRβ+ y células T CD8+ específicas de OVA, (B y F) respectivamente. * $p < 0,05$; * $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ prueba t para datos no apareados.**

- **Screening de mecanismos contra-reguladores a nivel intratumoral en animales tratados con *BayK8644* encapsulado en NPs de quitosano.**

Como se mencionó en la introducción de esta tesis, la presencia de mecanismos inmunológicos efectores es capaz de desencadenar mecanismos contra-reguladores. Para evaluar los posibles mecanismos involucrados en la inhibición del crecimiento tumoral en animales Respondedores al tratamiento con NP-BayK8644, se realizó la cuantificación de la expresión de ARNm en tumores E.G7-OVA de ratones Tmem176b C57Bl6 que fueron tratados con tres inyecciones de NP-BayK8644 intratumoralmente. Como se muestra en la Figura 7, mediante RT-qPCR no se observó diferencias significativas en la expresión de los ARNm de *Ido1*, *Rorc*, *Foxp3*, *Gata3* e *Il4* entre los animales respondedores al tratamiento en comparación con los animales progresores, a ese tiempo de progresión tumoral estudiada. Sin embargo, se observó diferencias significativas en la expresión de los ARNm de *Ctla4*, *Ifng*.

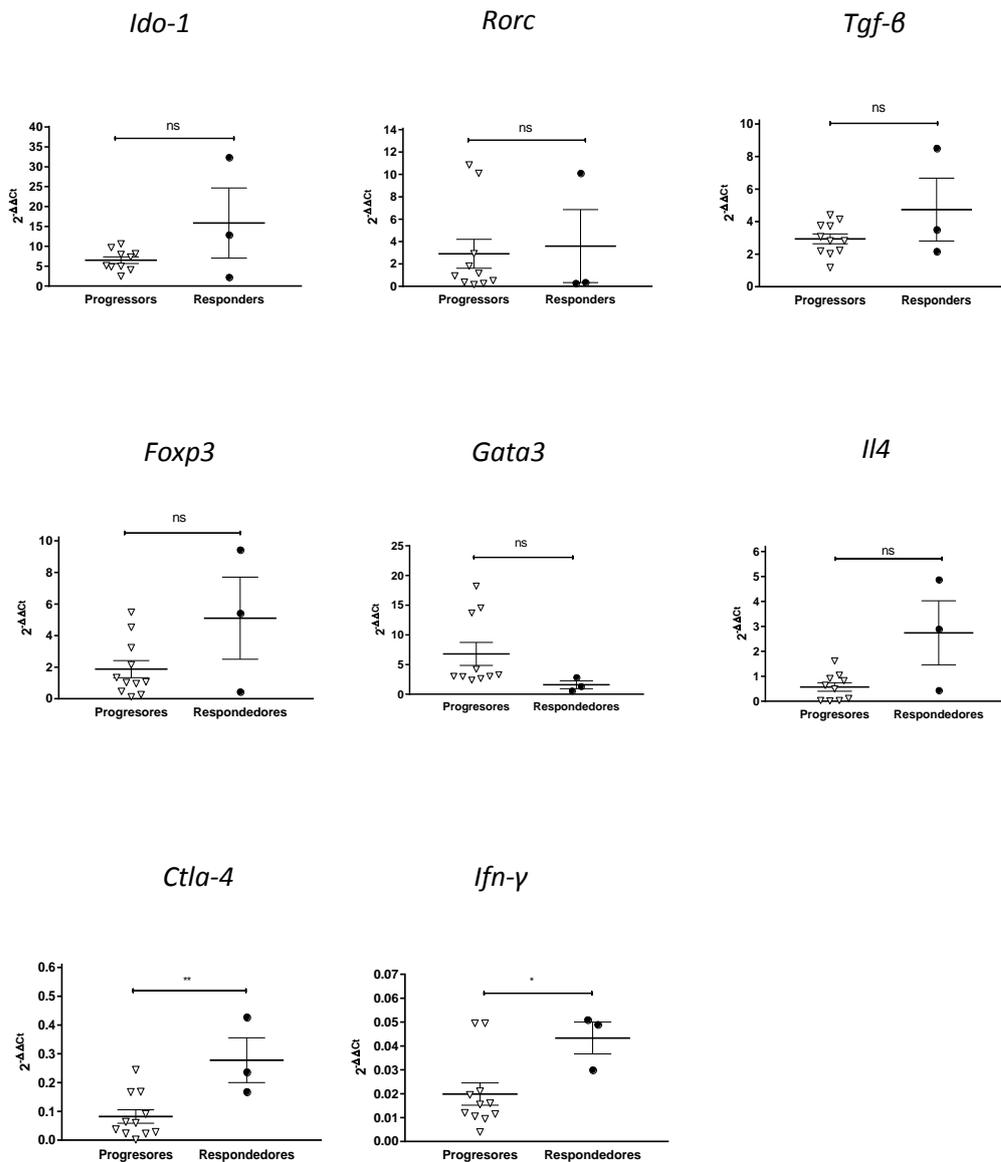


Figura 7. Expresión de mRNA de diferentes mediadores inmunológicos en tumores E.G7-OVA de ratones tratados con NP-BayK8644 analizada por RT-PCR. Se inyectaron con 5×10^5 células de la línea E.G7-OVA por vía subcutánea. Cuando el tumor alcanzó los 5 mm en su diámetro más largo se inyectó intratumoralmente NP-BayK8644 cada 2 días. 24 horas después de la tercera inyección de NP-BayK8644 se realizó la extracción de los tumores para analizar por RT-PCR cuantitativa la expresión de *Ido1*, *Rorc*, *Tgf-β*, *Foxp3*, *Gata-3*, *Il-4*, *Ctla-4* e *Ifn-γ*, normalizada por *Gapdh* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Cada punto en el gráfico corresponde a un animal. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, prueba t para datos no apareados. Para el análisis de la expresión de *Il-4* se realizó un test de Mann-Whitney, no paramétrico.

Resultados

▪ Parte I II

- **Las BMDCs derivadas de animales *Tmem176b* (WT) y *Tmem176b*^{-/-} poseen un fenotipo de células dendríticas convencionales de tipo 2 (cDC2).**

Nuestro segundo objetivo en este trabajo pretende estudiar la importancia de las cDC2 en la respuesta anti-tumoral inducida por el BayK8644, y su efecto sobre las células Th17. Para poder evaluar la capacidad de las BMDCs derivadas de C57BL/6 WT y *Tmem176b*^{-/-} de diferenciar células T CD4⁺ provenientes de ratones OT-II a células Th17, nos propusimos primero confirmar el fenotipo de las BMDCs en nuestro modelo de trabajo. El primer paso para cumplir este objetivo fue verificar por citometría de flujo la correcta diferenciación de las BMDCs, utilizando los marcadores de diferenciación y maduración de esta población (CD11c, CD11b, MHC-II, CD80, CD86, Ly-6G/Ly-6C (Gr1) (como lo describe Segovia y colaboradores ²¹⁵). Luego de esta caracterización estudiamos por citometría de flujo la expresión del marcador CD172α (SIRPα, “signal regulatory protein alpha”) en BMDCs WT y *Tmem176b*^{-/-}. En la Figura 8, se observa una población de células CD11c⁺MHCII⁺, cuyo porcentaje fue mayor al 99%, al realizar el análisis posterior de células CD172α⁺ dentro de las células CD11c⁺MHCII⁺, se obtuvo aproximadamente un 99 % de células CD172α⁺. En la Figura 8 se muestran los resultados de BMDCs WT, los cuales fueron similares a los obtenidos con las BMDCs provenientes de animales *Tmem176b*^{-/-} (no mostrados).

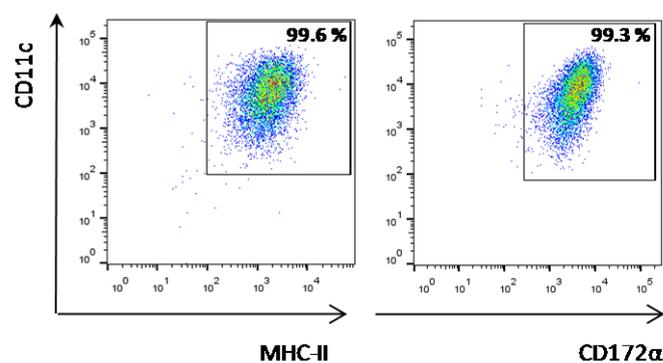


Figura 8. Las BMDCs derivadas de ratones *Tmem176b* C57Bl6 y de ratones *Tmem176b*^{-/-} poseen un fenotipo característico de células dendríticas convencionales de tipo 2 (cDC2). Mediante citometría de flujo se determinó en BMDCs derivadas de animales *Tmem176b* C57Bl6 y de ratones *Tmem176b*^{-/-} la expresión de marcadores celulares como CD11c, MHC-II y CD172α. En la figura se muestran resultados provenientes de BMDCs derivadas de animales *Tmem176b* (WT), que fueron similares a las BMDCs derivadas de animales ratones *Tmem176b*^{-/-} (datos no mostrados). El gráfico de punto de la izquierda proviene de un análisis de exclusión de dobletes y células viables, y muestra que un 99,6 % de las células expresa los marcadores MHC-II y CD11c. A partir de esta población MHC-II⁺CD11c⁺ se analizó la expresión del marcador CD172α (gráfico de punto de la derecha). Un 99,3 % de las células CD11c⁺ expresan el marcador CD172α.

● ***Las BMDCs derivadas de animales *Tmem176b*^{-/-} poseen mayor capacidad de diferenciar células T CD4⁺ provenientes de animales OT-II a células Th17.***

Para evaluar la capacidad de las BMDCs derivadas de animales WT y *Tmem176b*^{-/-} de diferenciar células T CD4⁺, provenientes de ratones OT-II, a células que poseen un fenotipo Th17, se realizaron experimentos de diferenciación *in vitro* y se determinó el fenotipo de las células T por citometría de flujo. Como se observa en la Figura 9 A, BMDCs derivadas de animales *Tmem176b*^{-/-} tratadas con LPS, fueron capaces de inducir un porcentaje significativamente mayor de células T CD4⁺IL-17⁺ que las BMDCs derivadas de animales WT que recibieron el mismo tratamiento con LPS. Así, BMDCs derivadas de animales *Tmem176b*^{-/-} poseen mayor capacidad de diferenciación a un fenotipo Th17 que las BMDCs derivadas de animales WT. En la Figura 9 B se observa el gráfico de puntos representativo de la cuantificación de la Figura 9 A, en el cual se observa la expresión de 6.03 % de células IL-17A⁺ evaluado dentro de la población de células T CD4⁺; dichas células T fueron cultivadas con BMDCs derivadas de animales WT. Por el contrario un 9,46 % de células fueron IL-17A⁺ evaluado dentro de la población de células T CD4⁺, cuando dichas células T fueron cultivadas con BMDCs derivadas de animales *Tmem176b*^{-/-}. La población de células IL-17A⁺ mostrada en la Figura 9 B proviene de un análisis previo de células

viables, en las cuales se realizó exclusión de dobletes y que expresaban el marcador CD4.

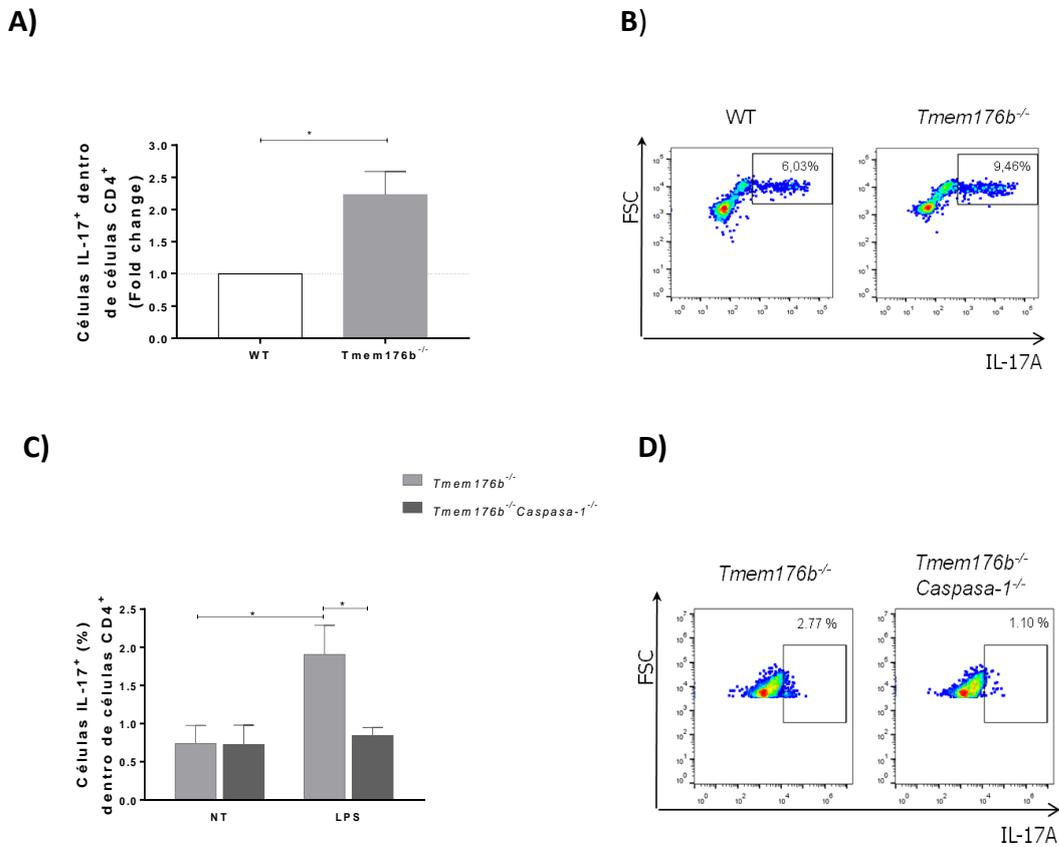


Figura 9. BMDCs derivadas de animales *Tmem176b*^{-/-} poseen mayor capacidad de diferenciar células T CD4⁺ a células con un fenotipo Th17, comparadas con las BMDCs derivadas de animales C57BL/6 WT y este efecto depende de la proteína Caspasa-1. Se cultivó cada tipo de BMDC (WT y *Tmem176b*^{-/-} en Figura A y B) ó (*Tmem176b*^{-/-} y *Tmem176b*^{-/-}Caspasa-1^{-/-} en Figura C y D) con células T derivadas de ratones OT-II, en una relación 1:5 (DCs:Células T). Al día 3 se adicionó IL-2 al cultivo. Al quinto día de cultivo se evaluó por citometría de flujo el porcentaje de células Th17, analizando la expresión de la citoquina IL-17 dentro de la población CD4⁺; (* p<0,05; two-way ANOVA. A, n=4 y B, n=3). Las figuras B y D muestran gráficos de puntos mediante la técnica de citometría de flujo que es representativo de la cuantificación realizada en A y C, respectivamente. Se muestra el porcentaje de células IL-17A⁺, evaluado dentro de la población de células T CD4⁺. La IL-17A fue evaluada utilizando un anticuerpo conjugado a APC, y el gráfico muestra la intensidad en este canal de fluorescencia (IL-17A-APC), y el tamaño celular (FSC) en las ordenadas del gráfico.

Utilizando el mismo protocolo que en (A), BMDCs derivadas de animales *Tmem176b*^{-/-} y *Tmem176b*^{-/-}*Casp1*^{-/-} fueron tratadas con LPS, Figura 9 C. Como se observa, BMDCs derivadas de animales *Tmem176b*^{-/-} tratadas con LPS poseen mayor capacidad de diferenciación a un fenotipo Th17 que las BMDCs derivadas de animales *Tmem176b*^{-/-}*Casp1*^{-/-} también tratadas con LPS. Este fenotipo de Th17 fue evaluado por citometría de flujo, al igual que en (A) cuantificando las células T IL-17⁺ dentro de la población de células T CD4⁺. Se utilizó como control negativo de diferenciación las BMDCs sin tratar (representado en la gráfica como NT). La Figura 9 D es el gráfico de puntos representativo de la cuantificación de la Figura 9 C, en el cual se observó que 2,77 % de las células CD4⁺ expresaron IL-17A⁺, cuando dichas células T fueron cultivadas con BMDCs derivadas de animales *Tmem176b*^{-/-}. Por el contrario, un 1,10 % de células fueron IL-17A⁺ evaluado dentro de las células T CD4⁺, cuando dichas células T fueron cultivadas con BMDCs derivadas de animales *Tmem176b*^{-/-}*Casp1*^{-/-}. La población de células IL-17A⁺ mostrada en la Figura 9 D proviene de un análisis previo de células viables, en las cuales se realizó exclusión de dobletes y que expresaban el marcador CD4.

● ***Subpoblaciones de cDC2 residentes de ganglio drenante de tumor (TDLN) provenientes de animales *Tmem176b*^{-/-} poseen mayor capacidad de diferenciación a células Th17 comparada con cDC2 provenientes de animales WT***

El resultado de la sección anterior confirma que, en un modelo *in vitro*, las BMDCs derivadas de ratones *Tmem176b*^{-/-} poseen mayor capacidad de diferenciar células T CD4⁺ provenientes de ratones OT-II a células con un fenotipo Th17. Además fue demostrado que este efecto *in vitro*, depende de la proteína Caspasa-1. Basado en estos resultados y en los resultados de la Figura 8 que fue demostrado el fenotipo cDC2 de las BMDCs en nuestro modelo de trabajo, nos planteamos estudiar la capacidad de las cDC de tipo 2 de diferenciar células T CD4⁺ a un fenotipo de células Th17. Para esto utilizamos un modelo *ex vivo*, en el cual la proteína *Tmem176b* está

presente o no (inhibida farmacológicamente o a través de inactivación génica (*Tmem176b*^{-/-})).

Como muestra la Figura 10 A, las cDC2 residentes derivadas de TDLN de animales *Tmem176b*^{-/-} poseen mayor capacidad de diferenciar células T CD4⁺, derivadas del bazo de animales OT-II, a un fenotipo de células Th17 comparadas con cDC2 residentes procedentes de TDLN de animales *Tmem176b* (WT). El gráfico de puntos representativo de la Figura 10 A, se muestra en la Figura 10 B donde 1,24 % de células IL-17A⁺ fueron determinadas cuando células T derivadas de animales OT-II fueron cultivadas con cDC2 derivadas de animales WT. Por el contrario, 2,14 % de células IL-17A⁺ se determinaron cuando células T derivadas de animales OT-II fueron cultivadas con cDC2 derivadas de animales *Tmem176b*^{-/-}. La población de células IL-17A⁺, mostrada en la Figura 10 B, proviene de un análisis previo seleccionando la población T CD4⁺, células viables y exclusión de dobles.

La Figura 10 C muestra que las cDC2 migradoras derivadas de TDLN de animales *Tmem176b*^{-/-} no presentaron diferencias en su capacidad de diferenciar células T CD4⁺, derivadas del bazo de animales OT-II, a un fenotipo de células Th17 comparadas con cDC2 migradoras procedentes de TDLN de animales *Tmem176b* (WT). La Figura 10 D muestra la cuantificación representativa de un experimento de la Figura 10 C. El procedimiento de análisis fue similar al de la Figura 10 B. Sin embargo los porcentajes fueron de 1,04% y 1,24% para WT y *Tmem176b*^{-/-}, respectivamente.

Luego utilizamos un modelo *ex vivo* en el cual la proteína *Tmem176b* fue inhibida farmacológicamente con el compuesto BayK8644. Los animales WT recibieron el tratamiento de 70 nanomoles de BayK8644 intraperitoneal ó su vehículo control (EtOH/PBS), durante 12 días, como detallado en la sección de esta tesis de Materiales y Métodos.

La Figura 10 E muestra que las cDC2 residentes procedentes de TDLN de animales que recibieron el tratamiento con BayK8644 no presentaron diferencias en su capacidad de diferenciar células T CD4⁺, derivadas del bazo de animales OT-II, a un fenotipo de células Th17 comparadas con cDC2 residentes derivadas de TDLN de animales que recibieron el tratamiento con vehículo control. La Figura 10 F muestra la

cuantificación representativa de un experimento de la Figura 10 E; en la cual se observa un porcentaje de células IL-17A⁺ de 0,98 % y 0,99 % para vehículo control y tratamiento con BayK8644, respectivamente.

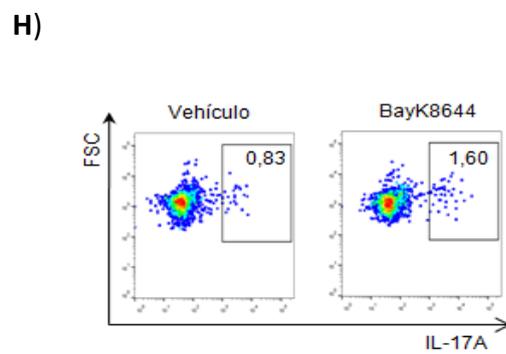
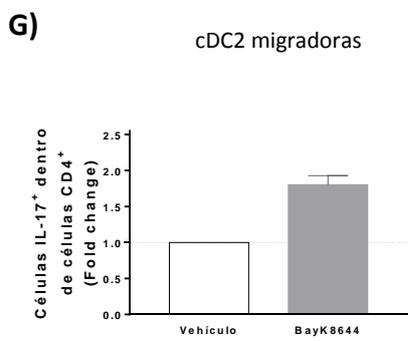
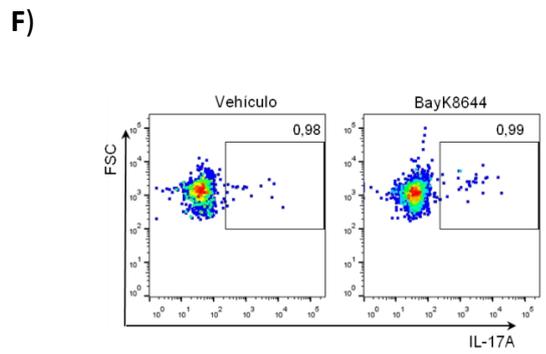
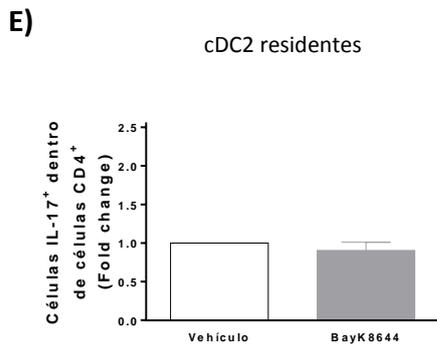
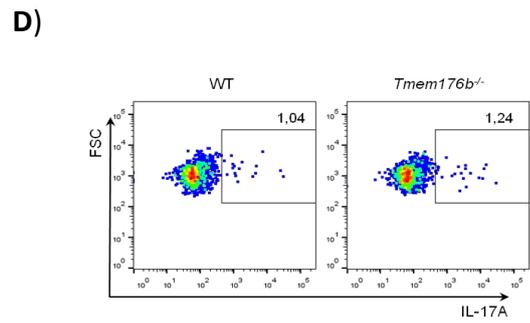
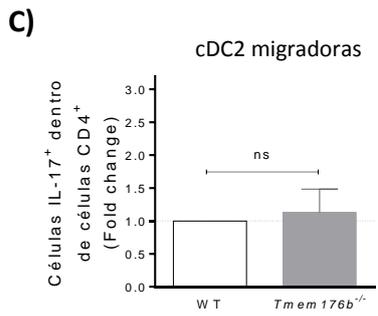
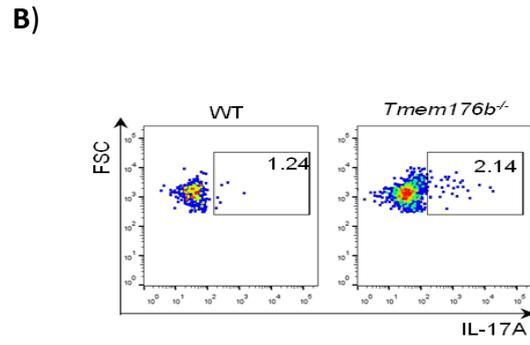
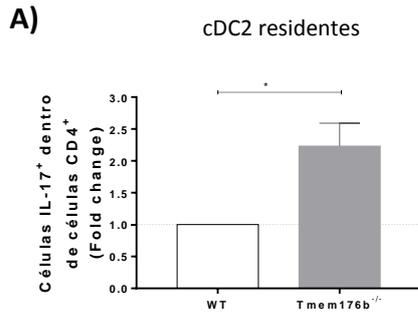
De manera interesante, las cDC2 migradoras derivadas de TDLN de animales que recibieron el tratamiento con BayK8644 poseen una tendencia a tener mayor capacidad de diferenciar células T CD4⁺, derivadas del bazo de animales OT-II, a un fenotipo de células Th17 comparadas con cDC2 migradoras derivadas de TDLN de animales que recibieron el tratamiento con vehículo control, Figura 10 G. El gráfico de puntos representativo de la Figura 10 G, se muestra en la Figura 10 H donde 0,83 % de células IL-17A⁺ fueron determinadas cuando células T derivadas de animales OT-II fueron cultivadas con cDC2 provenientes de animales que recibieron el tratamiento con vehículo control. Por el contrario 1,6 % de células IL-17A⁺ se determinaron cuando células T derivadas de animales OT-II fueron cultivadas con cDC2 derivadas de animales que recibieron el tratamiento con BayK8644.

Por último evaluamos la capacidad de las cDC de tipo 2 de diferenciar células T CD4⁺ a un fenotipo de células Th17 utilizando animales *Tmem176b*^{-/-} y *Tmem176b*^{-/-}*Caspasa-1*^{-/-}. Las cDC2 residentes derivadas de TDLN de animales *Tmem176b*^{-/-} poseen mayor capacidad de diferenciar células T CD4⁺, provenientes del bazo de animales OT-II, a un fenotipo de células Th17 comparadas con cDC2 residentes de TDLN de animales *Tmem176b*^{-/-}*Casp1*^{-/-} (Figura 10 I).

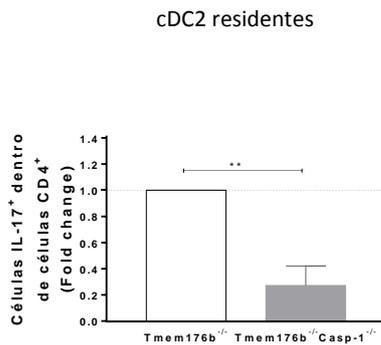
El gráfico de puntos representativo de la Figura 10 I, se muestra en la Figura 10 J donde fueron determinadas 5,05 % de células IL-17A⁺ cuando se cultivaron células T con cDC2 de animales *Tmem176b*^{-/-}. Sin embargo 2,59 % de células IL-17A⁺ se determinaron cuando células T fueron cultivadas con cDC2 de animales *Tmem176b*^{-/-}*Casp1*^{-/-}. La población de células IL-17A⁺, mostrada en la Figura 10 J, proviene de un análisis previo seleccionando la población T CD4⁺, células viables y exclusión de dobletes.

En la Figura 10 K, se muestra que las cDC2 migradoras derivadas de TDLN de animales *Tmem176b*^{-/-} tienen capacidades similares de diferenciar células T CD4⁺, provenientes del bazo de animales OT-II, a un fenotipo de células Th17 comparadas con cDC2 migradoras de TDLN de animales *Tmem176b*^{-/-}*Casp1*^{-/-}. La Figura 10 L muestra la

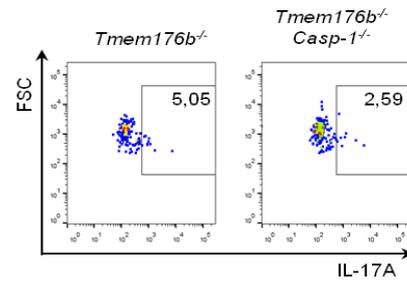
cuantificación representativa de la Figura 10 K; en la cual se observa un porcentaje de células IL-17A⁺ de 2,46 % y 1,69 % para *Tmem176b*^{-/-} y *Tmem176b*^{-/-}*Casp1*^{-/-}, respectivamente.



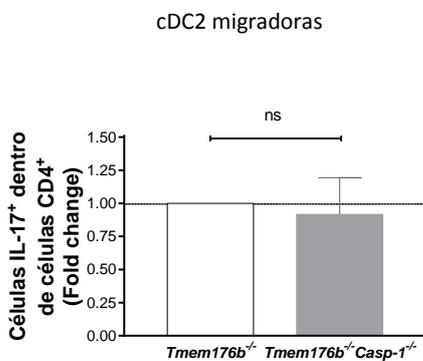
I)



J)



K)



L)

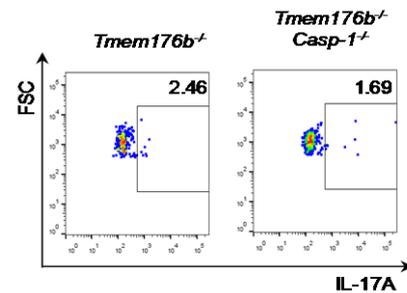


Figura 10. La subpoblación de cDC2 residentes en ganglio drenante de tumor (TDLN) provenientes de animales *Tmem176b*^{-/-} poseen mayor capacidad de diferenciación a células Th17 comparadas con células provenientes de animales C57BL/6 WT. Se realizó la separación celular por citometría de flujo (FACS) de cada subpoblación de cDC2 provenientes de TDLN, migradoras y residentes. Luego se cultivaron independientemente las subpoblaciones de cDC2 provenientes de cada tipo de animales (WT y *Tmem176b*^{-/-} en Figura A-D) ó (C57BL/6 WT tratado con vehículo y C57BL/6 WT tratado con BayK8644 en Figura E-H) ó (*Tmem176b*^{-/-} y *Tmem176b*^{-/-} *Caspasa-1*^{-/-} en Figura I-L) con células T derivadas de ratones OT-II, en una relación 1:5 y se adicionó la citoquina IL-2 al tercer día de cultivo. Al quinto día de cultivo se evaluó por citometría de flujo el porcentaje de células Th17, analizando la expresión de la citoquina IL-17 dentro de la población CD4⁺; (Figura A-D n=3; Figura E-H n=2; Figura I-L n=3). Las figuras B, D, F, H, J y L son gráficos de puntos representativos que muestran el porcentaje de células IL-17A positivas dentro de la población de células CD4⁺, evaluada por citometría de flujo.

● **La transferencia adoptiva de células con un fenotipo Th17 efector mejora el efecto anti-tumoral de la monoterapia con anticuerpo α -PD1.**

Nuestro resultado previo demostró que en un modelo *ex vivo*, las cDC2 residentes de TDLN provenientes de animales *Tmem176b*^{-/-} inducen mayor diferenciación a un fenotipo Th17 comparadas con cDC2 de animales *Tmem176b* (WT).

Con el objetivo de estudiar si las células Th17 con fenotipo efector están implicadas en el efecto antitumoral cuando el inflammasoma está activado, evaluamos en un modelo *in vivo*, que efecto tiene la transferencia adoptiva de células Th17, diferenciadas en presencia de IL-1 β , sobre la monoterapia de animales con el anticuerpo monoclonal α -PD1. Como se observa en la Figura 11, los animales que fueron previamente inoculados con la línea tumoral EG7-OVA, tratados con anticuerpo α -PD1, a los cuales se les transfirió adoptivamente células OT-II con fenotipo Th17 presentaron una mayor sobrevida comparados con los animales que recibieron PBS como control.

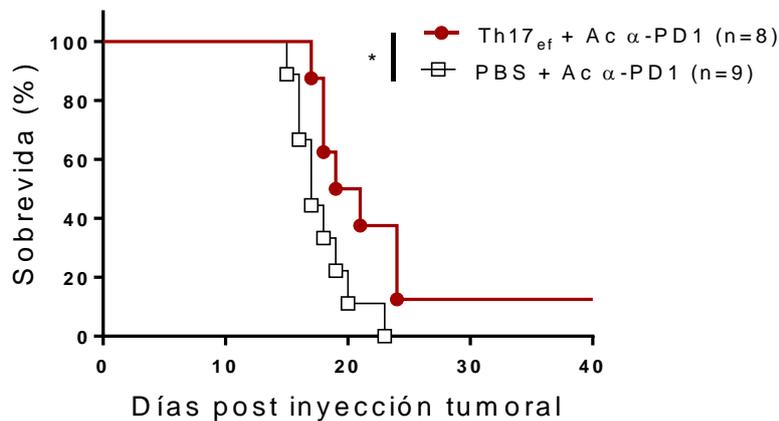


Figura 11. La transferencia adoptiva de células con fenotipo Th17 efector mejora el efecto anti-tumoral de la monoterapia con anticuerpo α PD1. Sobrevida de los animales C57Bl6 WT que fueron inyectados subcutáneamente con $5,0 \times 10^5$ de la línea celular de linfoma tímico EG7.OVA el día 0, y 200 μ g de anti-PD1 los días 6, 9 y 12. El día 9 un grupo se transfirió adoptivamente con 5×10^6 células OT-II fenotipo Th17 i.v., y el otro grupo recibió PBS i.v. Las células Th17 con un fenotipo efector fueron generadas *in vitro*, a partir de células T de bazo de animales OT-II. * $p < 0,05$; Prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox).

- *La transferencia adoptiva de células con un fenotipo Th17 efector provocó un mayor porcentaje de lisis específica, en un modelo in vivo de animales portadores de tumor y tratados con anticuerpo monoclonal α -PD1.*

Basado en el resultado de la sección anterior, que demostró que la transferencia adoptiva de células con un fenotipo Th17 efector mejora el efecto anti-tumoral de la monoterapia con anticuerpo α -PD1; nos propusimos evaluar la capacidad de lisis específica en un modelo *in vivo*, de animales que fueron previamente inoculados con la línea celular EG7-OVA y tratados con el anticuerpo monoclonal α -PD1. Como se observa en la Figura 12, se obtuvo una mayor lisis específica en esplenocitos de animales que poseían tumor, que fueron tratados con el anticuerpo α -PD1 y que además recibieron la transferencia adoptiva de células Th17 con un perfil efector, comparados con aquellos animales que recibieron PBS como control.

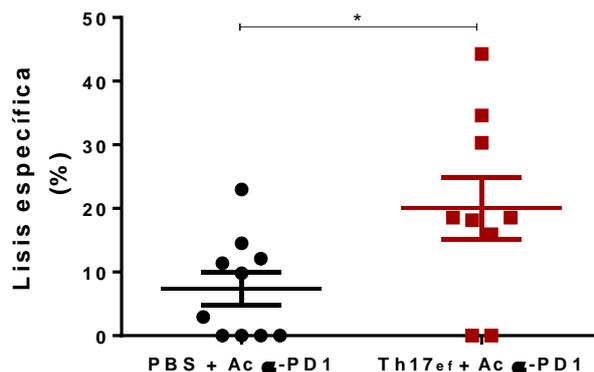


Figura 12. Estudio de citotoxicidad *in vivo* contra células que expresan OVA en ratones portadores de tumores EG7-OVA. Los esplenocitos de ratones C57BL/6 sin tratamiento previo se tiñeron diferencialmente con una sonda DDAO-SE 0.8 mM (alto) o 0.08 mM (bajo). La población de DDAO alta se cargó durante 60 min a 37°C con péptido SIINFEKL OVA 50 mM. Después de tres lavados, la población alta y baja se mezclaron en una proporción de 1: 1. Las células mixtas (2.0×10^6) se inyectaron por vía i.v en ratones portadores (o no “naive”) de tumores a los cuales se les realizó la transferencia adoptiva de células Th17 más el anticuerpo α -PD-1 o PBS más el anticuerpo α -PD-1. Cuatro horas más tarde, los ratones se sacrificaron y se cosecharon los bazo. Los esplenocitos se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar las poblaciones altas y bajas de DDAO. * $p < 0.05$; Prueba t de Student. La citotoxicidad específica se calculó utilizando la siguiente fórmula:
Porcentaje de lisis específica = $(1 - [r_{naive}/r_{portador\ de\ tumor}]) \times 100$.
 $r = \% \text{ de células DDAO}^{bajo} / \% \text{ de células DDAO}^{alto}$.

Discusión

Nuestro grupo había reportado que la inhibición farmacológica de Tmem176b desencadena respuestas inmunes anti-tumorales a través de la activación del inflammasoma y mediadas por linfocitos T CD8⁺¹²⁰. A pesar de que el tratamiento fue efectivo en protocolos profilácticos, no fue capaz de controlar el crecimiento de tumores establecidos. Entendimos que era necesario profundizar en los mecanismos inmunológicos implicados, con el fin de obtener información que nos permitiera mejorar la respuesta terapéutica. Dada la relevancia de las DCs en la respuesta anti-tumoral⁶⁴ y la fuerte expresión de Tmem176b en esos leucocitos¹²¹, planteamos que estudiar el impacto de la inhibición de Tmem176b en diferentes sub-poblaciones de DCs podría aportar elementos pertinentes para resolver nuestro problema. De esa manera, nos propusimos caracterizar el impacto de la inhibición de Tmem176b en cDC1 y cDC2. Ese conocimiento es importante para desarrollar formulaciones y/o tratamientos acompañantes que mejoren el efecto anti-tumoral del BayK8644. La identificación de los mecanismos implicados también podría aportar biomarcadores que eventualmente sean útiles en etapas de evaluación clínica de la estrategia anti-tumoral basada en el uso de BayK8644 que ha desarrollado nuestro laboratorio.

Hemos demostrado que la inhibición de Tmem176b con BayK8644, resulta en el bloqueo de una de las funciones más específicas de las cDC1, la presentación cruzada de antígenos^{9,99,224}. Entendemos que esto impacta directamente en la generación de una respuesta anti-tumoral eficiente.

Esta observación nos motivó a estudiar como potenciar la respuesta antitumoral en la subpoblación de cDC1 mediante el desarrollo de NPs que contienen al BayK8644. La encapsulación de BayK8644 en NP (NP-BayK8644) previene la inhibición de la presentación cruzada de antígenos mientras mantiene la capacidad de activación del inflammasoma NLRP3. El tratamiento con NP-BayK8644 en animales que poseen tumores establecidos, controló el crecimiento tumoral, de una manera dependiente de Tmem176b. El control tumoral se asoció con una mayor infiltración tumoral por células T CD8⁺ totales y específicas de tumor dentro del grupo de animales tratados con NP-BayK8644. En suma, la formulación de BayK8644 en NP mejoró la eficacia

antitumoral del compuesto libre al evitar la inhibición de la presentación cruzada de antígenos al tiempo que desencadena la activación del inflammasoma.

Entendemos que nuestro resultado *in vitro* de presentación cruzada de antígenos, en el cual la inhibición farmacológica de Tmem176b con el compuesto BayK8644 inhibió la presentación de la proteína OVA soluble en DCs esplénicas era un resultado esperable, ya que va en el mismo sentido que estudios previos de nuestro grupo que muestran que Tmem176b favorece la presentación cruzada de antígenos. DCs murinas deficientes en Tmem176b (Tmem176b^{-/-}) mostraron menor capacidad de presentar antígenos a las células T CD8⁺ por esta vía⁹⁷. Entendemos que sería interesante estudiar en detalle los mecanismos moleculares que intervienen en la inhibición de la presentación cruzada por el compuesto BayK8644.

La modulación del pH fagosomal en las DCs, es uno de los mecanismos que controlan el procesamiento de antígenos en el lumen del fagosoma, con esto surge la pregunta si la inhibición de Tmem176b con el compuesto BayK8644 modula el pH fagosomal. También nos interesa saber si al modular el pH del fagosoma se ve afectada la integridad del mismo, con una consecuente ruptura lisosómica y liberación de antígenos al citosol celular. Aportaría información a nuestro estudio mostrar a través de la expresión endógena de un determinado antígeno, si el compuesto BayK8644 está involucrado en la vía de presentación de antígeno endógena, restringido a las moléculas MHC-I. Sería curioso también evaluar si la internalización de un antígeno soluble, como la OVA, es regulado o no por el BayK8644.

El resultado anterior en el cual mostramos que el BayK8644 inhibe el proceso de presentación cruzada de antígenos (especialización funcional de las cDC1), nos indujo a buscar alternativas en el área de la nanomedicina para intentar prevenir la inhibición de la presentación cruzada de antígenos, al mismo tiempo que promover la generación de subpoblaciones de células T CD8⁺, responsables de una respuesta anti-tumoral. Para esto desarrollamos una estrategia de nanopartículas capaces de encapsular a nuestro compuesto de interés BayK8644. Diseñamos junto al grupo de los Dres. Helena Pardo y Álvaro Mombrú (Centro NanoMat, Instituto Polo

Tecnológico de Pando, Facultad de Química) nanopartículas de quitosano, que son nanocápsulas de envoltura polimérica y núcleo oleoso, en la que queda contenida más del 99 % del BayK8644. En la formulación de las NP-BayK8644 logramos obtener valores de tamaño de alrededor de los 200nm. Este tamaño siempre fue homogéneo durante las síntesis realizadas en esta tesis. Es necesario destacar la importancia del tamaño de las NPs, en formulaciones con un objetivo biológico, ya que partículas con un tamaño menor a 20-30 nm son generalmente eliminadas por vía renal mientras que las partículas con tamaños superiores a los 300 nm son eliminadas por opsonización, por fagocitos y macrófagos circulantes o pueden ser filtradas por el hígado o bazo^{225,226}. En la síntesis de nuestras NP-BayK8644 para el desarrollo de esta tesis se adicionó PEG para recubrir los nanosistemas y podemos afirmar que poseen una carga neta positiva. Sabemos por literatura que las nanopartículas con carga superficial positiva pueden establecer interacciones electrostáticas con las cargas negativas presentes en la superficie celular y penetrar las membranas plasmáticas, mientras que las nanopartículas con carga superficial negativa o neutra presentan bajos niveles de interacción e internalización celular^{193,227}. Además, las NPs más eficientes en captar los antígenos y en última instancia mejorar la presentación cruzada de antígenos exógenos, son aquellas que tienen carga superficial positiva¹⁹³. En cuanto a la forma, la esférica, la cual fue demostrada por imágenes de microscopía electrónica en esta tesis, provee mayor captación celular que la forma alargada debido a la simetría que éstas poseen²²⁸. Más aún, una propiedad fisicoquímica muy importante para determinar la estabilidad de la suspensión es el potencial Z. Un potencial zeta alto (en valor absoluto) típicamente mayor a 30 mV indica un coloide estable²²⁹. Las NP-BayK8644 sintetizadas en esta tesis siempre tuvieron un potencial Z mayor a 25 mV.

Logramos mediante una formulación nanotecnológica encapsular al BayK8644 en NPs de quitosano. Sabemos que las NPs son estrategias prometedoras para la liberación controlada de fármacos, especialmente en oncología¹⁸⁴.

Así, estudiamos el efecto de la encapsulación del BayK86644 sobre la presentación cruzada de antígenos y mostramos que dicha encapsulación logra evitar la inhibición de la presentación cruzada de antígenos mediada por el compuesto libre. Por lo

tanto, una formulación basada en nanotecnología fue clave para resolver un problema biológico como lo es la inhibición de la presentación cruzada por BayK8644. En el mismo sentido que nuestros resultados, y con el objetivo de potenciar la presentación cruzada de antígenos mediante el uso de nanopartículas, Gong y colaboradores describieron una nanovacuna que provocó un incremento en la presentación cruzada de antígenos y consecuente protección frente al desarrollo tumoral. La nanovacuna transformable facilitó la administración citosólica a las células del sistema inmune y promovió la presentación cruzada del antígeno. Además fue capaz de activar el inflamasoma NLRP3, aumentando así la inmunidad anti tumoral, a través de una respuesta de células T CD8⁺. El tratamiento combinado de la nanovacuna con la terapia con anticuerpo anti-PD-L1 provocó una disminución del crecimiento tumoral y una supervivencia prolongada de animales inyectados con células tumorales como B16F10-OVA y modelos de HPV E6/7 (TC-1)¹⁹⁸.

Otro enfoque utilizando NP para potenciar la presentación cruzada fue el descrito por Pei M y col. en el que se intenta escapar de la vía endosoma/lisosoma, y lograr que el antígeno (por ejemplo OVA) permanezca en el citosol, para ser luego presentado a linfocitos T CD8⁺. En este estudio los autores utilizaron NPs de polietilenoimina (PEI) que se caracteriza por el escape endosómico, por su efecto “esponja de protones”. Los grupos amina del PEI son capaces de captar protones del endosoma, provocando un efecto tamponador del pH del endosoma, acompañado por una acumulación de protones en el endosoma. Este incremento neto de la concentración de iones, provocaría la entrada masiva de agua al interior del endosoma, el hinchamiento y finalmente la ruptura del endosoma²³⁰.

Finalmente, en el mismo sentido que nuestros resultados, en los cuales pretendemos fomentar la presentación cruzada de antígenos, para desencadenar una respuesta inmune anti-tumoral Daniel Shae y colaboradores desarrollaron vesículas poliméricas (ó polimerosomas), los cuales son sensibles al cambio de pH. Dichos nanosistemas encapsulan eficientemente a cGAMP, que activa a STING. Cuando se desmontan en respuesta a la acidificación endolisosómica, las unidades del polímero desestabilizan la membrana del endolisosoma y promueven así el escape del mismo. Los antígenos tumorales encapsulados en dichas nanopartículas poliméricas sintéticas condujeron

al control tumoral en modelos de melanoma de ratón y cáncer de colon a través de mecanismos que involucran a STING²³¹.

Es importante destacar en el mecanismo de presentación cruzada de antígenos implica una acidificación gradual en el pH del fagolisosoma a lo largo del tiempo y que el procesamiento del antígeno en el compartimiento endofagosómico se produce mediante una cinética rápida⁹⁸. Entendimos relevante estudiar en nuestro modelo la liberación del compuesto BayK8644 de la nanopartícula de quitosano a diferentes niveles de pH, simulando el cambio gradual que se produce en los niveles de pH dentro del fagolisosoma, a lo largo del tiempo mientras ocurre el proceso de presentación cruzada de antígenos. Nuestros estudios en medio acuoso muestran que a pH ácido la liberación del BayK8644 es mayor. Este resultado era esperable, ya que el quitosano es un compuesto sensible a pH más ácido²³².

Entendemos que este experimento debe ser complementado con un estudio *in vitro* con DCs mediante microscopía de fluorescencia, evaluando la liberación del BayK8644 conjugado a biotina de la NPs de quitosano. Especulamos que en este estudio complementario, en el cual están presentes enzimas y proteínas fagolisosómicas que aceleran este proceso, obtendremos resultados similares de liberación del BayK8644 a pH ácidos, a tiempos menores a los determinados en medio acuoso.

Esto nos permite especular en el contexto de la presentación cruzada de antígenos, que el BayK8644 será liberado de la NPs luego de que ocurra la presentación cruzada de antígenos, ya que las DCs, mantienen los fagosomas y endosomas/lisosomas a un pH cercano a la neutralidad (7.5) durante 120 minutos, y luego el pH se acidifica^{9,92,97}.

Nuestro grupo previamente ha demostrado que Tmem176b se encuentra expresado en DCs convencionales y plasmocitoides y su localización es a nivel de la membrana endofagosomal, así como en la red trans-Golgi^{97,124}. En esta tesis mostramos en experimentos de microscopía confocal la colocalización de las NPs cargadas con una sonda fluorescente con la proteína Tmem176b. Nuestros resultados sugieren que que

el BayK8644 liberado por las NPs dentro de los endosomas estará en proximidad con la proteína TMEM176B.

En el objetivo de esta tesis plantemos nuestro interés en abodar un resultado previo de nuestro grupo que creemos importante para definir a Tmem176b como blanco en inmunoterapia oncológica y es que a diferencia de la respuesta anti-tumoral observada al inhibir farmacológicamente a Tmem176b con BayK8644 en un protocolo profiláctico, no se observó una respuesta anti-tumoral eficiente cuando el modelo fue terapéutico. Hemos logrado en esta tesis mediante la formulación de NP-BayK8644 aumentar la sobrevida y retardar el crecimiento tumoral, en un modelo *in vivo* terapéutico, con un tumor ya establecido. La protección observada frente al crecimiento tumoral con los nanosistemas NP-BayK8644 ocurrió de manera dependiente de Tmem176b. Así, mejoramos los resultados previos de nuestro grupo, en los cuales fuimos capaces de potenciar la inmunidad anti-tumoral y mejorar la eficacia de bloqueadores de puntos de control a través de la delección génica y/o del bloqueo farmacológico del canal iónico Tmem176b, con BayK8644 pero un modelo profiláctico¹²⁰. El aumento de la sobrevida y control del crecimiento tumoral mediante el tratamiento con NP-BayK8644 por vía intra-tumoral fue dependiente de la vía de administración, ya que la inyección de NP-BayK8644 por vía intravenosa (i/v) no generó protección frente al desarrollo de tumores. Esto puede deberse a que cuando la inyección es realizada por vía i/v los nanosistemas son generalmente reconocidos como cuerpos extraños y rápidamente son eliminados por el sistema fagocítico mononuclear, principalmente las células de Kupffer presentes en el hígado y los macrófagos del bazo³⁷. Una de las ventajas de la inyección de Nanopartículas por vía intratumoral, es que se aprovecha el efecto de permeabilidad y retención aumentada EPR (*enhanced permeation and retention*) mencionado en la introducción, el cual permite la acumulación de la NPs en el tumor. Esto es debido a que el proceso de angiogénesis del tumor presenta vasos sanguíneos dilatados que permiten la extravasación en el intersticio del tumor^{181,233}.

Para comprender mejor el mecanismo mediante el cual las NP-BayK8644 controlan el crecimiento tumoral determinamos la presencia de Caspasa-1 activa en los TDLN de animales con tumor establecido. En animales que recibieron el tratamiento terapéutico con NP-BayK8644 por vía intra-tumoral se observó activación del inflammasoma en TDLN. Este resultado de activación de Caspasa-1 en TDLN de animales tratados con NP-BayK comparado con animales tratados con eNP concuerda con el resultado obtenido previamente por nuestro grupo de trabajo, en el cual se observó que en los TDLN la activación de Caspasa-1 fue mayor en animales *Tmem176b*^{-/-}, comparado con su control WT. Este aumento fue observado únicamente en células dendríticas de tipo 2 (cDC2) residentes TDLN, pero no en las cDC2 migradoras ni en las cDC1¹²⁰. Cabe destacar que las cDC2 son CD11b⁺, las cDC1 residentes del ganglio son CD8α⁺, mientras que las cDC1 migradoras son CD103⁺²³⁴. Entendemos que es necesario verificar que el efecto anti-tumoral desencadenado por las NP-BayK8644 es específicamente dependiente de la activación de inflammasoma NLRP3. Para esto pretendemos realizar un experimento *in vivo* con animales *Caspasa1/11*^{-/-}, en los cuales creemos que se perderá el efecto protector de las NP-BayK8644. Además consideramos que sería importante mostrar en este punto que las NPs logran llegar a los TDLN de los animales, para lo cual ya disponemos de NPs cargadas con una sonda fluorescente 6-coumarin, que nos permitirá realizar el seguimiento de las mismas en el animal tratado con NP-6coumarin por vía intra-tumoral.

Mostramos también *in vitro*, que el BayK8644 encapsulado en NPs de quitosano estimuló el inflammasoma NLRP3 en BMDCs. Este efecto fue dependiente de *Tmem176b*. Este resultado está en el mismo sentido que lo que hemos reportado previamente que el compuesto BayK866 libre es capaz de activar el inflammasoma NLRP3 en BMDCs¹²⁰. Es importante recordar aquí que la composición química de la NP también influye en dicho fenómeno, el quitosano por sí mismo activa el inflammasoma NLRP3 e induce la ruptura lisosómica²³⁵⁻²³⁷.

En nuestro modelo de trabajo mostramos que el tratamiento con NP-BayK8644 al promover la presentación cruzada de antígenos, generaría una respuesta vía linfocitos T CD8⁺, responsables y necesarios para el desarrollo de la inmunidad antitumoral. Observamos en el TME de animales tratados con NP-BayK8644 una tendencia a tener mayor número de células T CD8⁺ totales y específicas contra antígenos de tumor comparados con animales tratados con eNP o con el compuesto BayK8644 libre. En este punto sería deseable mostrar que la respuesta antitumoral es efectivamente vía células T CD8⁺, para esto pretendemos realizar un experimento *in vivo*, en el cual las células T CD8⁺ serán depletadas mediante el uso de un anticuerpo α -CD8.

En el TME de animales tratados con NP-BayK8644 se observó una correlación positiva entre el tamaño tumoral y el número de células T CD8⁺ totales y específicas contra antígenos de tumor. También observamos dentro de este grupo, que los animales que responden al tratamiento con NP-BayK8644 poseen mayor porcentaje y número absoluto de células T CD8⁺ totales y específicas contra antígenos de tumor comparado con los animales progresores. Cuando analizamos las poblaciones de células T CD8⁺ en los TDLN, detectamos una tendencia a tener mayor infiltración en número absoluto de células T CD8⁺ totales y específicos de antígenos tumorales en TDLN de animales tratados con NP-BayK8644 comparados con animales tratados con eNP o con el compuesto BayK8644 libre.

El análisis de las células T CD8⁺ en TDLN y en el microambiente tumoral, por lo tanto, respaldan el rol de las NP-BayK8644 en preservar la presentación cruzada de antígenos y así mejorar las respuestas inmunes antitumorales. Sabemos que en un contexto de respuesta anti-tumoral, la activación de las células T contra antígenos exógenos, como lo son los antígenos tumorales, depende de la presentación cruzada de antígenos por parte de las CD^s⁹. En esta tesis demostramos que al encapsular al BayK8644 en NPs de quitosano, promovemos la presentación cruzada de antígenos, lo que induciría una respuesta de células T CD8⁺ anti tumoral. Además logramos obtener una respuesta inmune anti-tumoral con un tratamiento terapéutico con las NP-BayK8644, el cual no habíamos logrado con el compuesto libre. Este resultado se correlaciona con los resultados previos de nuestro grupo, donde demostramos que la

desinhibición del inflamasoma en ratones deficientes en *Tmem176b* resulta en un aumento en los linfocitos T CD8⁺ intratumorales, tanto totales como específicos del tumor, resultando en una mejor supervivencia que los ratones *Tmem176b* WT¹²⁰. Además, en ese trabajo fue demostrado el rol fundamental de las células T CD8⁺ al perder la protección frente al crecimiento tumoral en animales *Tmem176b*^{-/-} depletados de linfocitos T CD8⁺¹²⁰.

En el trabajo previo de nuestro grupo logramos potenciar la inmunidad anti-tumoral y mejorar la eficacia de bloqueadores de puntos de control a través de la delección génica y/o del bloqueo farmacológico del canal iónico *Tmem176b* con BayK8644 libre¹²⁰. Entonces, sería esperable que con el encare de NPs que encapsulan al BayK8644 también mejoraríamos la respuesta anti-tumoral en un contexto de terapia con anti-PD-1. Estudiamos el efecto de las NP-BayK8644 combinado a la terapia con anti-PD1, manteniendo el mismo protocolo que el utilizado en nuestros estudios previos, donde el BayK8644 fue administrado diariamente por vía intraperitoneal 3 días después de comenzar la terapia con anti-PD1¹²⁰. Sin embargo no tuvimos el efecto esperado, ya que no mejoramos el efecto de la monoterapia con anti-PD1 en este modelo combinado con NP-BayK8644. De todos modos sabemos que actualmente es altamente debatida la importancia de la secuencia y el momento en el cual realizar el bloqueo de puntos de control inmunológico (terapias como α -CTLA-4 ó α -PD-1) y como combinarlos con el uso de tratamientos para la modulación de las respuestas inflamatorias. En este sentido Verma y colaboradores mostraron recientemente que el tratamiento con anti-PD-1 cuando el cebado a las células T CD8⁺ ocurre en condiciones subóptimas confiere resistencia a la inmunoterapia y al fracaso terapéutico, ya que se generan células PD-1⁺CD38^{hi}CD8⁺ disfuncionales, este fenómeno puede revertirse mediante la estimulación antigénica adecuada. Los autores destacan que la secuencia adecuada de agentes inmunomoduladores es crucial para obtener buenos resultados terapéuticos²³⁸. Es por esto que estamos evaluando nuestro tratamiento con NP-BayK8644 más anti-PD1 en un orden inverso al ya investigado. Así cuando el tumor ya está establecido realizamos la inyección con

NP-BayK8644 para luego a las 24 horas posteriores comenzar el tratamiento con anti-PD1. Esperamos con esta secuencia de tratamiento, lograr mejorar la eficacia de bloqueadores de puntos de control. Está ampliamente demostrado, que las células T que se generan durante una respuesta inmune antitumoral es variable cuantitativamente y cualitativamente. En este contexto de diferencias cualitativas varios estudios han demostrado el subtipo responsable de promover una respuesta antitumoral en el contexto del bloqueo de PD-1, se trata de un subconjunto de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) que combina características de células T agotadas y células T de memoria y muestra un fenotipo único caracterizado por la coexpresión de PD-1, *Tcf-1* y *Tox*, así como la falta de expresión de TIM3^{106,239}. Esperamos que al invertir el orden de nuestro experimento con terapia combinada de NP-BayK8644 y anticuerpo anti-PD1 poder correlacionar la existencia de protección frente al desarrollo tumoral con la presencia en el TME de un mayor porcentaje de células progenitoras exhaustas con un fenotipo $Tcf-1^+Tox^+PD-1^+$.

Además previamente se había reportado que el bloqueo de PD-1 induce el rechazo tumoral al revitalizar a las células T CD8⁺, llevando a un aumento en la actividad funcional y en la frecuencia. El bloqueo de la señalización del eje PD-1 impide la atenuación de la señalización del TCR, permitiendo que se restaure la función efectora de alguna de las subpoblaciones de células T CD8⁺ exhaustas^{147,167}. Basados en la bibliografía mencionada sobre la respuesta inmune anti-tumoral en un contexto de terapia con BPC, consideramos que en nuestro modelo de inhibición de Tmem176b con el compuesto BayK8644, en el cual *in vitro* observamos que el BayK inhibe la presentación cruzada de antígenos, pero en modelo *in vivo* obtenemos una respuesta anti tumoral, y adicionalmente mejoramos el efecto de la terapia con BPC, hipotetizamos que las células T CD8⁺ encontradas dentro de los infiltrados tumorales (T CD8⁺ totales y específicos del tumor) podrían presentar un fenotipo de células T efectoras (CD8⁺GrzB⁺CD44⁺PD1⁻), y estamos investigando sobre qué subtipo de células exhaustas existen en el TME y en los TDLN de nuestro modelo.

Hasta ahora en esta discusión me he centrado en las consecuencias que tiene la inhibición de Tmem176b sobre el mecanismo de presentación cruzada de antígenos, característica funcional de la subpoblación cDC1.

Para estudiar el rol que tiene la activación del inflamasoma NLRP3 a través de la inhibición de Tmem176b en las cDCs de tipo 2, evaluamos el efecto sobre la diferenciación a un fenotipo Th17 y como esto afecta en la respuesta inmune anti-tumoral. Las cDC2 inducen la diferenciación a un perfil Th17⁷⁸. En esta tesis mostramos en un modelo *in vitro* y *ex vivo* la mayor capacidad que tienen las células que poseen el inflamasoma activado, de promover la diferenciación a un fenotipo Th17 comparada con las que no tienen el inflamasoma activado. Mostramos que este efecto se pierde en aquellas células que carecen de Caspasa-1, corroborando la dependencia de activación del inflamasoma.

Es importante resaltar aquí las diferencias que encontramos en esta tesis, en relación al tipo de cDC2 que participa (residentes versus migradoras) en la generación de un fenotipo Th17, entre la inhibición farmacológica de Tmem176b con el compuesto BayK86644 (cDC2 migradoras) y la delección génica (cDC2 residentes). Esto puede deberse a que la inhibición farmacológica es una inhibición aguda, bloqueando la función de la proteína Tmem176b, pero la proteína permanece expresada en la membrana endofagosomal. Así puede interactuar con otras proteínas o formar complejos, que puedan generar una respuesta compensatoria a tal inhibición. Además los animales que poseen la delección génica de Tmem176b, mantienen la expresión de su homólogo Tmem176a, sin embargo la inhibición farmacológica con BayK86644 es capaz de inhibir a ambas proteínas.

Los resultados antes mencionados en esta tesis están alineados con los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo, en lo que en un modelo experimental, se observó una mayor frecuencia de células TCRβ⁺CD4⁺RORgt⁺ en TDLN de animales *Tmem176b*^{-/-} en comparación con animales WT y animales *Tmem176b*^{-/-} tratados con anticuerpo anti-IL-1β. Además las células Th17 parecen tener un rol importante en el desarrollo de la respuesta anti-tumoral en ratones *Tmem176b*^{-/-}, ya que la neutralización de la IL-17A en estos ratones conduce a la pérdida del efecto anti-

tumoral. A su vez, la IL-1 β tiene un rol clave en la generación de estas células Th17, la neutralización de dicha citoquina en ratones Tmem176b^{-/-} resulta en una reducción en el número de células Th17 a nivel del ganglio que drena el tumor¹²⁰. En nuestros experimentos mencionados anteriormente en esta tesis, al co-cultivo de células dendríticas con células T CD4⁺, se le adicionaron las las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-23 e IL-2 al cultivo. Este microambiente citoquínico promovió la diferenciación de las células Th17 a un fenotipo efector ó patogénico.

Cabe recordar en este punto que uno de los programas efectores adaptativos que son activados por el eje inflammasoma/IL-1 β en un contexto de cáncer, son los linfocitos cooperadores Th17²⁴⁰. Sin embargo, el rol de las células Th17 en el cáncer es controvertido. Han sido reportados estudios que muestran un efecto anti-tumoral de las células Th17, así como otros que muestran su participación en la progresión tumoral. De hecho, una alta frecuencia en células Th17 en el infiltrado tumoral de pacientes con cáncer de colon, de hígado, o de páncreas se correlaciona fuertemente con un mal pronóstico. Sin embargo, un aumento en el número de células Th17 en tumores de ovario se ha asociado a mejor sobrevida^{114,115}. Como fue discutido en la introducción de esta tesis, estos hallazgos sorprendentes y controversiales, se deben en principio a la plasticidad de las células Th17. Fundamentalmente las células Th17 diferenciadas en presencia de IL-1 β , IL-6 e IL-23 no expresan CD39 y CD73. La expresión de CD39 y CD73 lleva a la transformación de ATP o ADP a adenosina, la cual tiene potente efecto inmunosupresor. Estas células co-expresan los factores de transcripción Tbet y ROR γ t, lo que resulta en la secreción de IFN- γ e IL-17, pero no IL-10. Estas células Th17, “tipo Th1”, median la regresión tumoral observada en algunos diseños experimentales^{109,111,115,116}.

Para estudiar el rol de las células Th17 en la respuesta anti-tumoral generada por la terapia con BPC, en esta tesis mostramos que la transferencia adoptiva de células (ACT) con fenotipo Th17 efector, diferenciadas en presencia de IL-1 β , mejora el efecto antitumoral de la monoterapia con anticuerpo anti-PD1. La ACT de las células Th17 mejoró la capacidad citotóxica *in vivo* de las células T CD8⁺ contra los antígenos

tumorales. Estos resultados sugieren que las células efectoras Th17 mejoran la inmunidad tumoral provocada por el bloqueo de PD-1.

Estos resultados son congruentes con resultados publicados por Orozco y colaboradores en lo que demuestran en un modelo de melanoma de ratón, que la transferencia de células adoptivas (ACT) de las células Th17 efectoras promueve la acumulación de DCs en el TME y la diferenciación de las células T CD8⁺ específicas del tumor en linfocitos T citotóxicos (CTL), necesarios para la respuesta anti-tumoral¹¹⁹.

En estudios con sangre periférica de humanos con cáncer de próstata y melanoma avanzado, Dulos y colaboradores demuestran que el bloqueo con la terapia anti-PD-1 induce una respuesta proinflamatoria Th17²⁴¹. Además, estudios en pacientes con melanoma metastásico que poseen una alta frecuencia de células Th17 mostraron una mayor inmunidad anti-tumoral inducida por las vacunas administradas, lo que se traduce a un aumento de la sobrevida del paciente¹¹⁸.

Sabemos actualmente que la terapia con BPC induce en los pacientes efectos adversos inmuno-relacionados, discutidos en la Introducción de esta tesis. En este contexto, Kim y colaboradores demostraron el aumento de células con un perfil Th17 en sangre periférica de pacientes con cáncer, previo al tratamiento con anticuerpo anti-PD1, en aquellos pacientes que presentaron efectos adversos severos²⁴². Sumado a este resultado, recientemente Nakamura *et al*, mediante estudios de RNAseq, no encontraron diferencias en el perfil de citoquinas relacionadas a las células Th17 en células de sangre periférica de pacientes con melanoma²⁴³.

Finalmente, me gustaría recordar que si bien los BPC han logrado resultados notables en el tratamiento de melanoma metastásico y otros tipos de cánceres, es necesario identificar, caracterizar y manipular nuevos puntos de control en la inmunidad anti-tumoral para lograr vencer mecanismos de resistencia primaria y secundaria. En este sentido se necesita profundizar en la investigación de los mecanismos desencadenados por los BPC para desarrollar biomarcadores predictivos de respuesta. Cabe recordar aquí que la IL-1 β es un factor determinante en las propiedades efectoras de las células Th17. Así, resta determinar en nuestros estudios si la activación del inflamasoma NLRP3 modula la diferenciación de células Th17.

Conclusión

Mostramos que el bloqueo con NPs de quitosano del inhibidor del inflamasoma TMEM176B controla el crecimiento tumoral de una manera dependiente de Tmem176b, e induce la presencia en el microambiente tumoral de un infiltrado de células T CD8⁺. La formulación nanotecnológica de BayK8644 nos permitió desencadenar la activación del inflamasoma en el TDLN evitando la inhibición de la vía de presentación cruzada. No obstante, se necesitan más estudios toxicológicos para trasladar este enfoque a entornos clínicos.

Además mostramos la importancia de la activación del inflamasoma NLRP3 en las cDC2 para inducir la diferenciación a células con un perfil Th17 efector o patogénico. Proponemos que la activación del inflamasoma *in vivo* podría ser una estrategia para potenciar las respuestas efectoras de las células Th17, y así superar los efectos adversos de la terapia con anti-PD1, como lo son las resistencias primarias y secundarias.

En suma, estudiamos en esta tesis el impacto de la inhibición de Tmem176b en diferentes subtipos de cDCs, cDC1 y cDC2 con el objetivo de desarrollar estrategias que permitan mejorar el efecto anti-tumoral del BayK8644 libre y además estudiamos mecanismos desencadenados al inhibir a Tmem176b.

Perspectivas

Como mencionado en la introducción de esta tesis es de interés en nuestro grupo de trabajo estudiar los mecanismos a través de los cuales el bloqueo de la vía PD-1 desencadena la inmunidad anti tumoral. La vía de PD-1 altera la activación de las células T y atenúa las funciones efectoras y la proliferación de las células T, lo que promueve la aparición de las células T agotadas ó exhaustas^{149, 165, 166}. El agotamiento (ó “exhausting”) de las células T es un mecanismo importante que limita la actividad de las mismas en presencia de estimulación antigénica crónica y actúa para preservar clones de linfocitos T que de otra manera sufrirían una muerte celular inducida por activación¹⁴⁷. La terapia con anticuerpo anti-PD-1 puede mejorar la inmunidad antitumoral al prevenir el agotamiento de las células T CD8⁺, al promover el cebado de las células T de novo y/o al modular las células que ya poseen un fenotipo de exhaustas.

En el trabajo previo de nuestro grupo logramos potenciar la inmunidad anti-tumoral y mejorar la eficacia de bloqueadores de puntos de control a través de la deleción génica y/o del bloqueo farmacológico del canal iónico Tmem176b con BayK8644 libre¹²⁰.

Como perspectiva general de este trabajo pretendemos estudiar el efecto de la terapia combinada de NP-BayK8644 junto a la terapia con anti-PD-1.

Con el objetivo de obtener un mayor beneficio en el uso de la inmunoterapia, debemos investigar cómo afecta en nuestro protocolo de trabajo la secuencia y el momento en el cual realizar el bloqueo de puntos de control inmunológico (con anti-PD-1) y cómo combinarlo con la activación del inflammasoma a través del uso de NP-BayK8644.

Pretendemos realizar estudios in vivo en lo cuales administraremos NP-BayK8644 por vía intratumoral y 24 horas posteriores a la primera inyección de NP-BayK8644, se comenzará con la terapia con anti-PD1 por vía intraperitoneal. Realizaremos un total de 3 inyecciones con anti-PD1 y 5 inyecciones con NP-BayK8644. Tenemos resultados preliminares que muestran un retraso en el crecimiento tumoral utilizando este protocolo, pero el número de animales es aún bajo.

Además pretendemos estudiar que poblaciones de células T exhaustas se generan en este modelo, así esperamos con nuestro experimento con terapia combinada de NP-BayK8644 y anticuerpo anti-PD1 poder correlacionar la existencia de protección frente al desarrollo tumoral con la presencia en el TME de un mayor porcentaje de células progenitoras exhaustas con un fenotipo Tcf-1⁺Tox⁺PD-1⁺.

Anexo1

Formulating a TMEM176B blocker in nanoparticles improves its anti-tumoral efficacy by reinforcing CD8⁺ T cells.

Sabina Victoria^{1,6}, Analía Castro^{2,6}, Daniela Olivera^{1,3}, Sofía Russo^{1,3}, Ignacio Cebrian⁴, Alvaro Momburu², Eduardo Osinaga^{3,5}, Helena Pardo^{2,7,*}, Mercedes Segovia^{1,3,7,*} and Marcelo Hill^{1,3,7,*}.

1. Laboratory of Immunoregulation and Inflammation, Institut Pasteur de Montevideo; 11400 Montevideo, Uruguay.
2. Centro NanoMat, Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, UdelaR, Camino Aparicio Saravia s/n, 91000 Pando, Canelones, Uruguay.
3. Immunobiology Department, Faculty of Medicine, University of the Republic. 11800 Montevideo, Uruguay.
4. Facultad de Ciencias Médicas, Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (IHEM)-CONICET/Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.
5. Laboratory of Tumor Immunology and Glycobiology, Institut Pasteur de Montevideo, Mataojo 2020 (C.P. 11400), Montevideo, Uruguay.
6. Equal contribution.
7. Co-senior authors.

Correspondence: mhill@pasteur.edu.uy; msegovia@pasteur.edu.uy; hpardo@fq.edu.uy.

Key words: Anti-tumoral immune responses, nanoparticles, TMEM176B, BayK8644, cross-presentation, inflammasome.

Abstract

Pharmacological blockade of the immunoregulatory cation channel TMEM176B with BayK8644 triggers anti-tumoral immune responses in an inflammasome and CD8-dependent manner. Although BayK8644 controls tumor growth in preventive protocols, it failed to do so in established tumors. Since TMEM176B promotes antigen cross-presentation, we speculated that BayK8644 may inhibit this process and thus limit its anti-tumoral efficacy. Here we show that BayK8644 does inhibit cross-presentation by splenic DCs to antigen-specific CD8⁺ T cells. To prevent such inhibition, we reasoned that formulating BayK8644 in nanoparticles may delay the release of the compound in endosomes. Avoiding TMEM176B inhibition at least during the first 30 minutes of nanoparticle internalization by DCs, may help cross-presentation to occur during that critical time frame. We indeed observed that BayK8644 encapsulated in NPs (NP-PEG-BayK8644) did not inhibit antigen cross-presentation, in contrast to the free compound. Moreover, NP-PEG-BayK8644 triggered inflammasome activation in a *Tmem176b*-dependent manner. We then injected empty NPs (eNP-PEG) or NP-PEG-BayK8644 to mice bearing established tumors. NP-PEG-BayK8644 significantly controlled tumor growth and mice survival as compared to eNP and free BayK8644 in a *Tmem176b*-dependent manner. NP-PEG-BayK8644 therapy was associated with increased inflammasome activation by dendritic cells in the tumor-draining lymph node. Moreover, responding animals treated with NP-PEG-BayK8644 showed reinforced tumor infiltration by total and tumor-specific CD8⁺ T cells. In conclusion, formulating BayK8644 in NPs improved its anti-tumoral therapeutic efficacy by inducing inflammasome activation while avoiding inhibition of antigen cross-presentation. Thus, a nanotechnology-based formulation was key to solve a biological problem such as inhibition of cross-presentation by BayK8644.

Introduction

Immunotherapeutic approaches have revolutionized cancer therapy (1). However, only a minority of treated patients have clinical benefits (2–4). We thus need to identify and target novel immunoregulatory molecules to trigger effective anti-tumoral immune responses. In this context, TMEM176B has been proposed as an emergent player in immunoregulation (5–7).

TMEM176A and TMEM176B are intracellular acid-sensitive non-specific cation channel which belong to the MS4A family (8–10). They are strongly expressed by mouse, rat and human DCs (8,10–14) among other leukocyte subsets. Functionally, TMEM176B plays a key role in tolerogenic DCs to prolong allograft survival (8). Moreover, we have shown that TMEM176B inhibits the NLRP3 inflammasome activation through ionic mechanisms in mouse and human DCs and macrophages (15). Inflammasomes are cytosolic multiprotein complexes that sense cellular stress and lead to Caspase-1-dependent activation of IL-1 β and IL-18 (16).

High TMEM176A/B expression has been associated with diminished overall survival in patients with colon (15), glioblastoma (17) and gastric cancer (18). Those data therefore support TMEM176A/B as potential pharmacological targets in oncology. Indeed, pharmacological and genetic evidence has shown that targeting TMEM176B triggers strong anti-tumoral immune responses which depend on host inflammasome activation and CD8⁺ T cell responses (15). *In vivo* TMEM176A/B blockade with BayK8644 controlled tumor growth in murine cancer models in preventive but not in therapeutic protocols (mice bearing established tumors) (15).

We speculated that pharmacological blockade of TMEM176B may impair antigen cross-presentation, a critical pathway to trigger anti-tumoral CD8⁺ T cell responses (19,20), and thus limit the therapeutic efficacy of BayK8644. Indeed, *Tmem176b*^{-/-} DCs showed undermined capacities of cross-presenting antigens to CD8⁺ T cells (8).

Limited V-ATPase-dependent phagosomal acidification and transient alkalinized phagosomal pH were observed in *Tmem176b*^{-/-} DCs during the first 30 minutes after phagocytosis, potentially explaining the cross-presentation defect (8). In fact, phagosomal pH is kept near neutrality by DCs to allow antigens to be cross-presented (21–24). Moreover, endo-phagosomal antigen processing occurs through a fast kinetic, since a time limit of 25 minutes has been proposed (25). Thus, exogenous antigens that were not processed before that time, would not be presented on MHC class I molecules (25). We therefore speculated that formulating BayK8644 through a strategy that allows a slow release kinetic in endosomes may prevent inhibition of cross-presentation by the compound while potentially maintaining its capacity to induce inflammasome activation. Chitosan nanoparticles (NPs) are known to slowly release hydrophobic compounds within hours in a process that is accelerated by acidic pH (26,27). Thus, chitosan NPs should avoid BayK8644 release in compartments such as early endosomes with neutral pH where antigen processing for cross-presentation is thought to take place. Once cross-presentation occurred, BayK8644 release might still trigger inflammasome activation.

Here we show that BayK8644 does inhibit antigen cross-presentation. BayK8644 encapsulation in NPs (NPBayK8644) prevents such inhibition while still triggering inflammasome activation. NP-PEG-BayK8644 controlled tumor growth of established tumors in a *Tmem176b*-dependent manner. Tumor control was associated with increased inflammasome activation by DCs in tumor-draining lymph nodes (TDLN) and with tumor infiltration by total and tumor-specific CD8⁺ T cells within the NP-PEG-BayK8644-treated animals. Thus, formulating BayK8644 in NPs improved the anti-tumoral efficacy of the compound by triggering inflammasome activation while preventing the inhibition of antigen cross-presentation.

Results

BayK8644 inhibits antigen cross-presentation by splenic DCs *in vitro*.

We first studied whether BayK8644 inhibits antigen cross-presentation *in vitro*. Enriched splenic CD11c⁺ DCs from WT mice were pulsed with OVA protein and co-cultured with the OVA-specific CD8⁺ B3Z T cell hybridoma in which the β -Gal enzyme is under the control of the IL-2 promoter (32). OVA induced a dose-dependent activation of B3Z cells (Figure S1). We observed that treating splenic DCs with BayK8644 significantly decreased their capacity to activate B3Z cells (Figure 1A). Conversely, BayK8644 did not inhibit activation of B3Z cells induced by the minimal OVA peptide SIINFEKL (Figure 1B). Thus, these results suggest that BayK8644 interferes with the processing of OVA protein through the cross-presentation pathway in splenic DCs. Formulating BayK8644 through a strategy that avoids inhibition of cross-presentation may therefore improve the anti-tumoral immune responses triggered by the compound.

Encapsulation of BayK8644 in chitosan nanoparticles.

Processing of antigens through the cross-presentation pathway is known to require a fast kinetic (33). The rate of antigen release in endo-phagosomes directly affects cross-presentation efficiency, with an apparent time limit of 25 minutes post internalization for antigen release to be productive (33). Accordingly, transient alkalinized phagosomal pH during the first 30 minutes after phagocytosis was associated with impaired cross-presentation in *Tmem176b*^{-/-} DCs (8). We therefore reasoned that formulating BayK8644 through a slow releasing mechanism in the endosomal compartment might avoid inhibition of cross-presentation by the compound. Chitosan nanoparticles (NPs) have been characterized as drug-encapsulating strategies that release compounds with a slow kinetic (26,27). We therefore speculated that encapsulating BayK8644 in chitosan NPs may avoid

inhibition of cross-presentation by the compound while probably keeping its inflammasome-activation capacity.

Chitosan NPs (semi-crystalline linear polysaccharide composed of N-acetyl D-glucosamine and D-glucosamine units linked by β (1-4) glucosidic bonds) were synthesized and coated on their surface with polyethylene glycol (PEG), which forms a protective hydrophilic layer around the nanoparticles (28). Thus, empty pegylated NPs (eNP-PEG), pegylated NPs containing the compound (+)-BayK8644 (NP-PEG-BayK8644) and pegylated NPs containing the fluorescent probe 6-coumarin (NP-PEG-6cou) were synthesized. The average size, the polydispersity index (PI) and the Z potential of the NPs as well as the efficiency of encapsulation of the formulation containing BayK8644, are detailed in Table 1. The NPs size was obtained by using a Nano Zetasizer, showing an average size close to 200 nm, which is within the range of optimal sizes to improve the biological fluids circulation time of NPs, as well as for its cellular internalization (34). We can also conclude that the colloidal solutions obtained are stable, since their Z potential is less than 30 mV. The BayK8644 encapsulation efficiency in all the performed syntheses was always greater than 99%. In Figure 2 A, the TEM images of NP-BayK8644 and eNP show their spherical shape and a homogeneous size distribution. The sizes obtained by TEM are smaller than those obtained by Nano Zetasizer and shown in Table 1. This difference in size measurement arises because in solution the ions of opposite charge will be attracted to the surface of the nanoparticles generating ionic layers that move along with it, and the Nano Zetasizer measures the nanoparticles hydrodynamic diameter in solution, while the TEM reports the actual diameter of the NPs without the ionic layer (35).

In Figure 2 B, *(ESPECTRO RAMAN) the study by confocal Raman microscopy allowed to evaluate there are notorious differences between the spectra of pure BayK8644 and chitosan NPs with respect to that obtained with chitosan NPs loaded with BayK8644, obtaining a spectrum different from the one that would have been*

used. obtained only by adding the individual spectra. This indicates that there must have been a chemical interaction between the constituent materials of the NPs and the BayK8644 molecule. The latter is important when it comes to obtaining an adequate release of the BayK8644 molecule, which would occur from the lipid phase as the wall of

We then studied the *in vitro* release kinetics of BayK8644 from NPs at different pHs. As expected (26,27), we observed a slow kinetic release of the compound (Figure 2C). Acidic pH increased the percentage of released BayK8644 since 24 h incubation of the NPs with the buffer (Figure 2C). Thus, encapsulation of BayK8644 in chitosan NPs is highly efficient, generates NPs with physicochemical characteristics compatible with their use with cells and releases the compound with a slow kinetic.

NP-PEG-BayK8644 do not inhibit antigen cross-presentation by DCs but still trigger inflammasome activation.

To further determine whether encapsulation of BayK8644 in chitosan NPs may reinforce the anti-tumoral properties of the compound, we studied whether and how NPsBayK8644 modulate DCs biology. We therefore first assessed their internalization by DCs. Flow cytometry studies showed that BMDCs efficiently internalizes NP-6cou, increasing both the percentage of 6cou⁺ cells (Figure 3A, B) and 6cou mean fluorescence intensity (MFI) (Figure 3A, C) in comparison to untreated cells and BMDCs incubated at 0°C as a control to minimize active internalization. Confocal microscopy experiments showed that at 0°C the NPs were lying at the cell surface, whereas at 37 °C the NPs were in fact within the BMDCs (Figure 3D). Moreover, we observed that NPs6-cou co-localized with the TMEM176B protein (Figure 3E), suggesting that NPs are internalized by TMEM176B⁺ endosomes (8). Thus, BayK8644 released by NPs within endosomes will be in proximity to TMEM176B.

We then wished to determine whether BayK8644 encapsulated in NPs may inhibit antigen cross-presentation by DCs. Splenic DCs were loaded with OVA protein \pm BayK8644 or \pm NPBayK8644 and co-cultured with B3Z CD8⁺ T cells. We observed that in contrast to BayK8644, NPBayK8644 failed to block activation of B3Z cells (Figure 3F). Furthermore, treatment of DCs with NP-PEG-BayK8644 induced the secretion of IL-1 β at higher levels than eNP-PEG in WT but not in *Tmem176b*^{-/-} DCs (Figure 3G). Moreover, NP-PEG-BayK8644 were at least as effective as BayK8644 in triggering IL-1 β secretion (Figure 3H). NP-PEG-BayK8644 were more effective than eNP-PEG and BayK8644 in inducing Caspase-1 activation in DCs (Figures 3I-J and Figure S2). Thus, NP-PEG-BayK8644 trigger inflammasome activation in DCs while preventing inhibition of antigen cross-presentation by BayK8644.

Therapeutic treatment with BayK8644 encapsulated in chitosan NPs increases survival and retards tumor growth in a *Tmem176b*-dependent manner.

Having shown that NP-PEG-BayK8644 do not inhibit antigen cross-presentation while still triggering inflammasome activation, we then studied whether those NPs may control tumor growth *in vivo* in a therapeutic setting. We had shown that although BayK8644 injected i.p before tumor establishment controlled its growth (preventive protocol), it failed to do so in animals with established tumors (therapeutic protocol) (15).

To evaluate the therapeutic efficacy of NPBayK8644, *in vivo* studies were carried out in WT mice carrying established EG7 tumors. We observed that intratumoral injection of NPBayK8644 significantly improved mouse survival and controlled tumor growth as compared to animals injected with eNPs (Figure 4A, D). In contrast, when *Tmem176b*^{-/-} animals were treated with NP-PEG-BayK8644 or eNP, we found no difference in mouse survival nor tumor growth in those conditions (Figure 4B, E). Thus,

NPBayK8644 control tumor growth through a *Tmem176b*-dependent mechanism. Additionally, intratumoral injection of BayK8644 also failed to control tumor growth and improve mouse survival in comparison to vehicle-treated animals (Figure 4C, F). To further understand how NP-PEG-BayK8644 may control tumor growth, we assessed inflammasome activation in the tumor-draining lymph nodes (TDLN) of animals treated with NPBayK8644 or eNP. In fact, we had reported that i.p BayK8644 was associated with increased Caspase-1 activation in the TDLN and controls tumor growth in a *Casp1/11*-dependent manner (15). Indeed, we observed that NP-PEG-BayK8644 induced higher percentages of Caspase-1⁺ DCs in the TDLN than eNP-PEG (Figure 4G). Moreover, the anti-tumoral effect of NP-PEG-BayK8644 was inflammasome-dependent, since it was abrogated in *Casp1/11*^{-/-} mice (Figure 4H).

Increased tumor infiltration by total and tumor-specific CD8⁺ T cells is associated with tumor control in NP-PEG-BayK8644-treated animals.

We then speculated that, in addition to its capacity to trigger inflammasome activation, preventing antigen cross-presentation inhibition by BayK8644 may enhance the anti-tumoral efficacy of NP-PEG-BayK8644. Anti-tumoral CD8⁺ T cells are primed in the TDLN through the cross-presentation pathway. We therefore studied CD8⁺ T cells by flow cytometry in the TDLN from EG7 tumors-bearing animals treated with BayK8644, eNP-PEG or NP-PEG-BayK8644. According to our hypothesis, absolute numbers of tumor-specific and total CD8⁺ T cells were increased in the TDLN from NP-PEG-BayK8644 mice in comparison with BayK8644 and eNP-treated animals, although statistical significance was not reached (Figure 5A-B). A similar trend was found in the tumor microenvironment for absolute numbers of total and tumor-specific (Figure 5C-D) CD8⁺ T cells, when comparing the three therapeutic groups. We did find a significant positive correlation between the size of tumors and the absolute numbers

of total (Figure 5E) and tumor-specific (Figure 5F) tumor-infiltrating CD8⁺ T cells within the NP-PEG-BayK8644-treated group. Accordingly, we observed a significant increase in the percentage and absolute number of intratumoral total CD8⁺ T cells in animals controlling tumor growth (responders) versus progressors within the NP-PEG-BayK8644-treated group (Figure 5G-I). Similar results were found when analyzing intratumoral tumor-specific CD8⁺ T cells (Figure 5J, K, I). The analysis of CD8⁺ T cells in the TDLN and tumor microenvironment therefore supports a role for preserved antigen cross-presentation in the anti-tumoral properties of NP-PEG-BayK8644.

Discussion.

High TMEM176A/B expression has been associated with diminished overall survival in different human tumors, suggesting that it is a potential pharmacological target to control cancer progression (15,17,18). BayK8644 triggers inflammasome and CD8⁺ T cell-dependent anti-tumoral immune responses leading to tumor control in preventive but not in therapeutic protocols (15). Here we report that formulating the TMEM176A/B inhibitor BayK8644 in chitosan nanoparticles prevents inhibition of antigen cross-presentation while strongly triggers inflammasome activation. This approach improves the anti-tumoral efficacy of the compound, allowing the control of established tumors in mice. Thus, a nanotechnology-based formulation was key to solve a biological problem such as inhibition of cross-presentation by BayK8644.

Understanding the mechanisms by which NP-PEG-BayK8644 control tumor growth is key to develop pharmacodynamic biomarkers which might help to determine which patients may respond to this approach in translational settings. Rational combination of therapies may also arise through this approach. Nevertheless, future work should study whether, as observed with BayK8644, NP-PEG-BayK8644 therapy may also be associated with increased CD4⁺ RorγT⁺ T cells and IL-17A production (5,15).

NPs are promising strategies for the controlled release of drugs, particularly in oncology (36). Although chitosan is considered a safe polymer, variations in origin, composition and molecular weight among other parameters have complicated the translational pathway of chitosan nanoparticles (37). Our study adds proof of concept of the reinforced anti-tumoral properties of BayK8644 through its encapsulation in nanoparticles. Further research will need to determine whether encapsulation of the compound in NPs of other materials will give similar results in preclinical models. The mechanisms studied here reveal that independently of the material used, BayK8644

should not be released at early time points after NP internalization to avoid inhibition of cross-presentation.

We have previously shown that its pharmacological blockade is not associated with toxicities in mice (15), though further toxicological studies in larger species are needed to position BayK8644 as a drug candidate. Additionally, immune-related adverse events triggered by TMEM176A/B inhibition remains to be determined. Nevertheless, we know that *Tmem176b*^{-/-} mice do not suffer from spontaneous autoimmune disease (8,15).

Triggering inflammation to improve anti-tumoral immune responses and improve cancer immunotherapy is a matter of intense research (6,38). Specifically, intratumoral injection of inflammogenic NPs have shown promising results to control tumor growth. β -cyclodextrin nanoparticles loaded with the TLR-7 and TLR-8 agonist R848 sensitized the mouse colon tumors MC38 to anti-PD-1 therapy by polarizing tumor-associated macrophages to an M1 phenotype (39). The use of NPs has also been reported to trigger anti-tumoral immune responses in a STING (Stimulator of Interferon genes; TMEM173)-dependent manner. Tumoral antigens encapsulated in synthetic polymeric nanoparticles led to tumor control in mouse melanoma and colon cancer models through mechanisms involving STING (40). Moreover, endosomolytic polymersomes designed for the cytosolic delivery of STING agonists (cGAMP) improved the anti-tumoral therapeutic efficacy of the dinucleotides (41). In a different approach, endosomal disruption in DCs using polymer NPs loaded with tumoral peptides led to effective inhibition of tumor growth in mouse melanoma through mechanisms involving cross-presentation and NLRP3 inflammasome activation (42). Thus, combining STING agonists with TMEM176B inhibitors in a rationally designed NP that also allows the cross-presentation pathway to occur might result in strong inflammatory stimuli to trigger tumor immunity.

In conclusion, here we show that blocking the inflammasome inhibitor TMEM176B with NPs controls tumor growth in a *Tmem176b*, inflammasome and CD8⁺ T cell-dependent manner. The nanotechnological formulation of BayK8644 allowed us to trigger inflammasome activation in the TDLN while avoiding inhibition of the cross-presentation pathway. Nevertheless, further toxicological studies are needed to translate this approach into clinical settings.

Acknowledgments.

This work was supported by Uruguay INNOVA-2 from ANII, PEDECIBA, ECOS-SUD and FOCEM (MERCOSUR Structural Convergence Fund) COF 03/11 grants to MH.

Author contributions.

Conceptualization, M.H., M.S., H.P., A.M. and EO; Methodology, SV and AC; Validation, IC, AM, HP, MS and M.H.; Investigation, S.V, A.C., D.O, S.R. and M.S. Writing – Original Draft, MH, M.S. and H.P. Funding Acquisition, M.H, HP; Resources, C.L., R.A.F, I.A. and M.C.C.; Supervision, M.H, M.S. and H.P.

Declaration of interests.

MH is founder and CSO of ARDAN Pharma. One patent application related to this work has been filed at the USA Patent and Trademark Office.

Figure legends.

Figure 1. Free BayK8644 inhibits cross presentation in splenic dendritic cells .

A) CD11c⁺ splenic DCs were loaded with 3mg/ml soluble OVA for 4 hours ± 10 μM or 20 μM of free BayK8644. Then, DCs were extensively washed, fixed, and cultured (18 hs) with the β-galactosidase-inducible B3Z T-cell hybrid, which is specific for the OVA peptide (SIINFEKL) in association with H-2Kb MHC-I molecules. B3Z T cell activation was measured by assessing β-galactosidase activity in a colorimetric assay. A pool of three independent experiments is shown. ***p < 0.001, ****p < 0.0001. One-way ANOVA test.

B) Splenic DCs were loaded for 45 minutes with the OVA peptide SIINFEKL, which does not need further processing in intracellular compartments to be presented on H-2K^b MHC-I molecules ± 20μM BayK8644. DCs were then washed and fixed and co-cultured with B3Z T cells. A pool of three independent experiments are shown. ***p < 0.001, ****p < 0.0001. Unpaired Student's t test.

Figure 2. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles (csNP).

A) Transmission electron micrograph (TEM) image showing spherical morphology and physical diameter of csNPs. Note that csNPs sizes are fairly uniform and it reveals the conserved csNPs size distribution.

B) The Raman spectrum of NP-BayK (in red), free BayK8644 (blue) and empty NP (black).

C) Cumulative drug release profiles of BayK8644-encapsulated NPs at different pH conditions. The NP-BayK8644 displayed a pH-dependent BayK8644 release profile. NP-BayK8644 solution was dissolved in RPMI culture media at the indicated pH (pH

5.0, pH 6.0 and pH 7.4). The amount of free BayK8644 released was determined by HPLC at different time points.

Figure 3. Chitosan nanoparticles are internalized by DCs, do not inhibit antigen cross-presentation and trigger inflammasome activation.

A) BMDCs were treated *in vitro* with 6-coumarin encapsulated NPs (NP-6cou) for 30 minutes, at 37°C or 0°C as a negative endocytosis control. A representative dot plot is shown with the percentage of 6-coumarin positive cells of BMDCs treated with NP-6cou at 37°C (red dots), compared with BMDCs treated with 6-coumarinNP at 0°C (cyan dots). Grey dots represent untreated BMDCs.

B) Percentage of 6-coumarin positive cells. A pool of three independent experiments is shown. ** $p < 0.01$, One-way ANOVA test.

C) Mean Fluorescence Intensity (MFI) of 6-coumarin dye determined by flow cytometry; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. One-way ANOVA test.

D) Confocal microscopy analysis of BMDCs treated with NP-PEG-6cou (green fluorescence) at the indicated temperatures (0°C and 37°C). Nuclei were stained with DAPI (blue fluorescence). One experiment representative of three is shown. At least 50 cells were analyzed/experiment.

E) Confocal microscopy study showing the colocalization of NP-PEG-6cou and the Tmem176b protein. BMDCs from Tmem176b (WT) mice and *Tmem176b*^{-/-} mice were treated with NP-PEG-6cou for 30 minutes, then the immunostaining were performed with anti-Tmem176b (red) antibody. Nuclei were stained with DAPI (blue). The graph shows the colocalization representation by the intensity profiles of anti-TMEM176B staining (red) and NP-PEG-6cou (green) obtained using ImageJ software, along the indicated yellow line inside the white square. The fluorescence intensities are plotted

along the y-axis and the image position along the x-axis. One experiment representative of three is shown. At least 50 cells were analyzed/experiment.

F) CD11c⁺ splenic DCs were left untreated or loaded with 3mg/ml soluble OVA for 4 hours ± 20 µM BayK8644, NP-PEG-BayK8644 or eNP-PEG. B3Z T cell activation was assessed through a colorimetric assay. A pool of three independent experiments is shown, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. One-way ANOVA test.

G) WT and *Tmem176b*^{-/-} BMDCs were treated with LPS (0.25 µg/mL) for 3 hours, washed and exposed for 2 hours to 50 µM BayK8644 encapsulated in chitosan nanoparticles (NP-PEG-BayK8644), or an equivalent amount of empty NPs (eNP). IL-1β was measured in the culture supernatant by ELISA. One experiment representative of three is shown. ****p < 0.0001. Two-way ANOVA test.

H) WT BMDCs were treated with LPS (0.25 µg/mL) for 3 hours, washed and exposed for 2 hours to 50 µM BayK8644 encapsulated in chitosan nanoparticles (NP-PEG-BayK8644), or an equivalent amount of empty NPs (eNP) or 50 µM free BayK8644. IL-1β was measured in the culture supernatant by ELISA. One experiment representative of three is shown. ****p < 0.0001. Two-way ANOVA test.

I) WT BMDCs were treated as in H. Inflammasome activation was studied by assessing Caspase-1 quantification by Flow cytometry using the FLICA-1 reagent. Representative dot plots are shown for the FLICA quantification by flow cytometry. One experiment representative of five is shown.

J) A pool of the five experiments commented in I is shown. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. One-way ANOVA test.

Figure 4. Therapeutic treatment with BayK8644 encapsulated in chitosan nanoparticles (NP-PEG-BayK8644) increases mice survival and reduces tumor growth compared with empty nanoparticles (eNP-PEG).

WT and *Tmem176b*^{-/-} animals were inoculated with EG7 tumors. Once tumors reached 25 mm², animals were i.t. injected with 70 x10⁻⁹ moles of BayK8644, NP-PEG-BayK8644 or eNP-PEG. Treatments were repeated every two days reaching a total of five injections. Mice were euthanized when the longer diameter reached tumors reached >200 mm.

Mouse survival of WT mice injected with NP-PEG-BayK8644 or eNP-PEG. **p< 0.01. Log-rank (Mantel-Cox) Test.

Mouse survival of *Tmem176b*^{-/-} injected with NP-PEG-BayK8644 or eNP-PEG. ns= not significant. Log-rank (Mantel-Cox) Test.

Mouse survival of WT mice injected with vehicle control or BayK8644. ns= not significant. Log-rank (Mantel-Cox) Test.

Tumor growth follow up in WT mice injected with NP-PEG-BayK8644 or eNP-PEG.

Tumor growth follow up in *Tmem176b*^{-/-} injected with NP-PEG-BayK8644 or eNP-PEG.

Tumor growth follow up in WT mice injected with vehicle control or BayK8644.

Percentage of FLICA-1 (Active Caspase-1) positive cells within CD11c+MHC+ conventional DCs in the TDLN 15 days after tumor cell inoculation in WT animals i.t. injected with eNP-PEG or NP-PEG-BayK8644. *p< 0.05, Student's t test.

Figure 5. Tumor control in NP-PEG-BayK8644-treated mice is associated with tumor cell infiltration by CD8⁺ T cells.

WT mice were subcutaneously injected with 5.0×10^5 cell line E.G7-OVA. BayK8644, eNP-PEG or NP-PEG-BayK8644 were i.t injected every 2 days when tumors size reached 25 mm^2 . CD8^+ T cells were studied in cellular suspensions from tumors and TDLNs harvested at 24 hs after the third NP or BayK8644 injection from the indicated groups. Animals from three experiments are shown. Absolute numbers are expressed by 1×10^5 tumor cells ($\text{V}\beta 12^+$ cells). When indicated, NP-PEG-BayK8644-treated animals were classified as responders if at the resection time their tumor sized $< 100 \text{ mm}^2$ and as progressors if they sized $> 100 \text{ mm}^2$.

A) Absolute numbers of OVA-specific CD8^+ T cells in tumors.

B) Absolute numbers of total CD8^+ T cells in tumors.

C) Absolute numbers of OVA-specific CD8^+ T cells in tumors.

D) Absolute numbers of total CD8^+ T cells in tumors.

E) Correlation study between the tumor-infiltrating total OVA-specific CD8^+ T cell absolute numbers and tumor size (mm^2). Correlation test.

F) Correlation study between the tumor-infiltrating CD8^+ T cell absolute numbers and tumor size (mm^2). Correlation test.

G) Relative frequency of total CD8^+ T cells among $\text{V}\beta 12^-$ cells in tumors of NP-PEG-BayK8644-treated mice comparing progressor and responder animals. *** $p < 0.001$, Student's t test.

H) Absolute numbers of total CD8^+ T cells among $\text{V}\beta 12^-$ cells in tumors of NP-PEG-BayK8644-treated mice comparing progressor and responder animals. *** $p < 0.001$, Student's t test.

I) Representative flow cytometry dot plots of total and OVA-specific CD8^+ T cells in tumors of NP-PEG-BayK8644-treated mice comparing progressor and responder animals.

J) Relative frequency of OVA-specific CD8⁺ T cells among Vβ12⁻ cells in tumors of NP-PEG-BayK8644-treated mice comparing progressor and responder animals. * p < 0.05, Student's t test.

K) Absolute numbers of OVA-specific CD8⁺ T cells among Vβ12⁻ cells in tumors of NP-PEG-BayK8644-treated mice comparing progressor and responder animals. *** p < 0.05, Student's t test.

Tables.

Table 1. Physico-chemical properties of the nanosystems obtained (mean \pm s.d.; n=3)

Type of nanosystem	Size \pm SD (nm)	PDI \pm SD	Zeta potencial \pm SD (mV)	Encapsulation efficiency (%)
csNP	180.7 \pm 15.0	0.249 \pm 0.075	27.8 \pm 1.3	
csNP-PEG	173.4 \pm 4.1	0.218 \pm 0.020	25.9 \pm 5.7	
csNP-PEG-BayK8644	209.9 \pm 11.9	0.198 \pm 0.032	24.6 \pm 2.2	99.8 \pm 0.1
csNP-PEG-6cou	199.1 \pm 2.65	0.228 \pm 0.006	24.2 \pm 1.04	

Materials and methods.

Nanoparticle Synthesis

Synthesis of CS-PEG copolymer

100 mg of chitosan-HCl (Protasan UP CL113), 27.6 mg of MeO-PEG-COOH, 2.4 mg Biotin-PEG-CO₂H and 3.4 mg of NHS were dissolved in 14 mL of water. Then, 69 mg of EDC was added in four equal portions every 30 minutes. The resulting solution was stirred for 24 hr at room temperature, and then was ultrafiltered (Amicon 10KDa) with water and lyophilized to give chitosan-PEG as a white foam.

Preparation of CS nanoparticles

Synthesis of blank chitosan nanoparticles (NpCS) were prepared by using the solvent displacement technique, described by Torrecilla et al. ((28)) based on the solvent displacement method, with some modifications. Briefly, 40 mg of Lecithin were dissolved in 0.5 mL of ethanol before adding 125 µL of Crodamol and 9.5 mL of acetone. This organic phase was directly poured over 20 mL of aqueous phase containing 10 mg of CS and 50 mg of Poloxamer 188. The mixture turned milky immediately as a result of the formation of CSNp. Finally, solvents were evaporated under vacuum to a final volume of 10 mL. BayK8644 and fluorescent probe (6 coumarin) loaded CSNp formulations were prepared as described above by adding 0.5 mL of ethanolic BayK8644 solution (20 mg/mL) and 1 mL of ethanolic Coumarin solution (1mg/mL) to the organic phase respectively. The final BayK8644 concentration obtained in CSNp was 1 mg/mL.

Nanoparticles characterization

Particle size and zeta potential

Hydrodynamic diameter and zeta potential of samples were obtained using a Nano-ZetaSizer (Malvern Instruments Ltd., UK). Analyses were performed in aqueous

medium at 25 °C, viscosity of 0.8872 cP and RI of 1.33. Particle size was read in terms of z-average and zeta potential was calculated from measured electrophoretic mobility using the Helmholtz-Smoluchowski equation. Samples were analyzed in triplicate.

Surface morphology

The morphology of the nanocarriers was examined by transmission electron microscopy (TEM), JEOL JEM-1010. Samples were stained with 2% (w/v) phosphotungstic acid solution and placed on copper grids (200-mesh) for viewing by TEM.

Encapsulation Efficiency of BayK8644-Loaded CSNp

The encapsulation efficiency of BayK8644 in the CSNp was determined indirectly by the difference between the total amount of BayK8644 in the formulation and the free drug found in the supernatant of the formulation. Consequently, the total amount of drug was estimated by dissolving an aliquot of nonisolated BayK8644-loaded CSNp with acetonitrile and measured with a high performance liquid chromatography (HPLC) system. The non-encapsulated drug was determined by the same method following separation of the CS structures from the aqueous medium by ultracentrifugation. The HPLC system consisted of a Thermo Scientific Ultimate 3000 equipped with a UV detector set at 410 nm and a reverse phase Zorbax Extend 300 C18 column (4.6 × 150 mm i.d., pore size 3.5 µm Agilent, U.S.A.). The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile:water (50:50 v/v). The standard calibration curves of BayK8644 were linear ($r^2 > 0.999$) in the range of concentrations between 0.1-1.4 µg/mL.

Animals

Six-to-ten weeks old male or female C57BL/6 *Tmem176b* (WT) and *Tmem176b*^{-/-} mice were used (Jackson Lab; Bar Harbor, ME) and bred for up to 20 generations in

the Transgenic and Experimental Animals Unit (UATE) of the Pasteur Institute in Montevideo in conditions free of specific pathogens (SPF). These were kept in a controlled environment, with a temperature between 19 and 21°C, and cycles of 14 hours of light and 10 hours of darkness. Mice received water and sterile ration administered under ad libitum conditions. *Tmem176b*^{-/-} 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 in ((29)). All experiments were performed according to local regulation and approved by the Institut Pasteur de Montevideo.

Cell line culture

The E.G7-OVA (expressing OVA antigen) cell line (ATCC® CRL-2113™, (Manassas, VA), thymic lymphoma of murine origin) was cultured in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (SBF), 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, MEM-1% non-essential amino acids, 0.05 mM β-mercaptoethanol, penicillin/streptomycin 100 units/mL and 0.4 mg/mL geneticin. It was kept at 37°C in the presence of 5% CO₂.

Tumor Models and Treatments

Tmem176b and *Tmem176b*^{-/-} C57BL/6 mice were injected s.c with 0.5 x 10⁶ E.G7-OVA thymic lymphoma cells. At the indicated experiment, injection was performed alternating one *Tmem176b* and one *Tmem176b*^{-/-} mouse until completing both groups. In treated animals, alternation was done between BayK8644- and vehicle-treated animals or NP-BayK8644 and eNP-treated animals. Tumor growth was caliper measured manually every 2-3 days, and the two major diameters were taken. 70 nmoles of free BayK8644 or BayK8644 encapsulated in chitosan nanoparticles, or the same amount of empty NPs injections were repeated at the +2, +4, +6, +8 days after

the first injection. Mice were sacrificed when one of the major tumor diameters reached 2 cm.

Primary culture of dendritic cells derived from bone marrow (BMDCs)

Dendritic cells derived from bone marrow (BMDCs) were obtained performing the protocol described by Segovia et al ((30)). For this, the femurs and tibiae bone marrow was extracted of Tmem176b and Tmem176b^{-/-} C57BL/6 mice. After red blood cells lysis, 5.0×10^6 cells were seeded in Petri dishes, in RPMI supplemented medium (10% fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 1 % non-essential MEM-amino acids, 2 mM L-glutamine , 0.05 mM β -mercaptoethanol, penicillin/streptomycin 100 units/mL). Thus, bone marrow-derived DCs were differentiated by culturing bone marrow cells for 8 days in the presence of 0.4 ng/mL GM-CSF. On day 3 and 6, the growth medium was renewed, adding GM-CSF to the culture each time. At day 8, adherent cells were >95% CD11c⁺CD11b⁺MHC II^{int} evaluated by flow cytometry analysis.

Nanoparticles uptake by Bone Marrow Dendritic Cells (BMDCs).

At day 8, BMDCs were detached with a buffer solution containing SFB and EDTA. For confocal microscopy internalization studies, 1.0×10^5 cells were seeded in a 12-well plate, glass cover slips were previously placed in each well. Cells were allowed to adhere for 1,5 hours and stimulated for 30 minutes with 6 coumarin-NP at 37°C to allow endocytosis process or 0°C (as a negative control), washed and then chased for 15 minutes at the same conditions. All images were taken using a Zeiss LSM 800™ semi-spectral confocal laser scanning microscope (Beckman Coulter). For flow cytometry internalization studies, the same protocol was followed as mentioned above. BMDCS were collected and samples were acquired using Cyan ADP Flow Cytometer equipped with a 488 nm laser and a band filter (530/40 nm). For data analysis FlowJo v.X software (BD, Ashland, OR, USA) was used.

Colocalization Studies by Confocal Microscopy

Tmem176b^{+/+} (WT) and *Tmem176b*^{-/-} C57BL/6 BMDCs were plated in 12-well plate (1×10^5 cells/well) containing glass cover slips and cultured for 1,5 hours. Then cell were treated with 6-coumarin NPs during 30 minutes, washed and chased for 15 minutes. Cells were fixed in 2% (w/v) paraformaldehyde (PFA) for 15 min, permeabilized and blocked using TritonX100 0,1%, 3% BSA in PBS. Primary antibody, rabbit anti-mTMEM176B Polyclonal antibody (Proteintech Group) 5 μ g/mL, or a control IgG antibody, was diluted in BSA-PBS-Triton solution and incubated overnight at 4 °C. Three washing steps were performed using PBS solution. Biotina-donkey anti-Rabbit IgG (H+L) secondary antibody diluted 1:500 in BSA-PBS-Triton was added and incubated for 1,5 hours. After washing, cells were incubated with Streptavidin Alexa Fluor 568 conjugate (Molecular Probes) diluted 1:1000 in BSA-PBS-Triton. Finally, nuclei were stained with DAPI diluted 1:5000 (Life Technologies) and incubated for 5 minutes. Sections were mounted in ProLong antifade mounting medium (Molecular Probes). Fluorescence was observed by confocal microscopy Zeiss LSM 800™ semi-spectral.

In Vitro Inflammasome Activation

IL-1 β was quantified in BMDCs culture supernatant as a readout of the NLRP3 inflammasome activation. As mentioned above, at day 8, 5.0×10^4 BMDCs were seeded in a 96-well plate, and allowed to adhere for 1,5 hours. Then, cells were stimulated for 3 hs with 0.25 μ g/mL LPS, washed and treated for 2 hours with the indicated doses of free BayK8644, NP-BayK8644 and eNP. The presence of IL-1 β was determined with a ELISA kit, according to the manufacturer protocol (Biolegend, 432603).

To determine Caspase-1 activation by 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) antibodies. Quantification was carried out using ImageJv.1.5i software and for statistical analysis.

Caspase-1 activation was quantified in *Tmem176b* BMDCs culture as a readout of the NLRP3 inflammasome activation. As mentioned above, at day 8, BMDCs were seeded (5×10^5 cells) in 35 mm culture dishes, and allowed to adhere for 1,5 hours. Cells were stimulated for 2 hr with 100 μ M of free BayK8644, NP-BayK8644 and eNP and then washed. BMDCs were stained with FLICA-1 (FLICA 660 Caspase-1 Assay, ImmunoChemistry) for 30 minutes, and analyzed by flow cytometry using Cyan ADP Flow Cytometer equipped with a 488 nm laser and a band filter (530/40 nm). For data analysis FlowJo v.X software (BD, Ashland, OR, USA) was used.

Antigen cross-presentation assays in mouse splenic dendritic cells.

To obtain splenic DCs, spleen of C57Bl6 mice was extracted, cut into small pieces and treated with collagenase-D (Roche, Merck). After 30 minutes of incubation at 37 °C, the enzymatic reaction was stopped with a 10 mM EDTA solution. Lysis of red blood cells was performed with an ammonium chloride solution. Finally, cells were washed with PBS/SFB1%. For the isolation of CD11c⁺ cells, murine anti-CD11c monoclonal antibodies coupled to magnetic microspheres supplied in the commercial kit "CD11c MicroBeads UltraPure, mouse" (Miltenyi Biotec Inc, Auburn, CA, USA) were used according to the protocol suggested by the manufacturer. Briefly, splenic cells were labeled with anti-CD11c antibodies conjugated to the beads. The cells were allowed to pass through a magnetic column subjected to a magnetic field. Thereby, CD11c⁺ cells were retained on the column. Then, the column was removed from the

influence of the magnetic field and cells were eluted. The purity of the CD11c⁺ fraction was confirmed by flow cytometry.

CD11c⁺ spleen cells were incubated with 3 mg/mL of soluble OVA, or OVA plus 20 μ M of free BayK8644, 20 μ M of BayK8644 encapsulated into chitosan nanoparticles (NP-BayK8644) or empty counterpart (eNP) for 4 hours in supplemented-RPMI medium. Also, as a control, CD11c⁺ spleen cells were incubated with SIINFEKL peptide at indicated concentrations or SIINFEKL peptide plus BayK8644 for 4 hours in supplemented-RPMI medium. Cells were then washed with PBS/BSA 1% and fixed with 0.008 % glutaraldehyde for 3 minutes on ice and quenched with 0.2 M glycine solution. After one final wash with PBS, CD11c⁺ spleen cells were incubated with the B3Z cell line (T cell hybridoma cell line) for 18 hours at 37°C and 5% CO₂. B3Z cell line specific for SIINFEKL allowed us to study the T cells activation, and was kindly provided by Ignacio Cebrián (Membrane Fusion Laboratory, IHEM -CONICET; Faculty of Medical Sciences, UNCuyo). The B3Z cell line is a β -galactosidase (lacZ) inducible T cell hybridoma. They are stably transfected with the Dectin-1-CD3 ζ chimeric construct (Dectin-1 extracellular region fused to the CD3 ζ cytoplasmic region). Furthermore, these cells are transiently transfected with an NFAT-LacZ reporter gene (activated T-cell nuclear factor NFAT, fused to the E. coli lacZ gene); since CD3 ζ triggers an intracellular signal that leads to the activation of the transcriptional factor NFAT. Previous studies demonstrated that the heterologous lacZ gene, under the control of the complete enhancer region of IL-2 or NFAT alone, is specifically induced in transfected and activated T cells. Therefore, activation of transfected T cells results in the synthesis of the products of the IL-2 and lacZ genes. The activation of B3Z cell line was measured detecting β -galactosidase activity by optical density (absorbance at 595–655 nm) using chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (CPRG; Roche) as substrate for the reaction.

Ex vivo isolation and flow cytometry analysis of CD8⁺ T cells

Tmem176b C57BL/6 mice were injected s.c with $0,5 \times 10^6$ EG7 thymic lymphoma cells. When tumors were palpable (tumor size of 5mm x 5mm), 70 nmoles of BayK8644 encapsulated in NPs was intratumorally injected. NPs injections were repeated at the +2, +4 days after the first injection. After the third NP-BayK8644 injection, tumors were resected.

Animals treated with NP-BayK8644 were classified according to tumor growth kinetics. Those animals that control tumor growth over time (tumor size at the resection time were $<100\text{mm}^2$) were named Responders. Inversely, those animals did not control the tumor size were called Progressors. T cells were isolated by dissociating tumor tissue in the presence of collagenase D (1 mg/ml) (Roche- Merck) for 10 min at 37°C. Reaction was stopped with EDTA 10mM, and the suspension was filter through a 50 μm strainer. After red blood cell lysis, flow cytometry analysis was performed. For flow Cytometry analysis, single cell suspensions were stained with antibodies against surface molecules CD8 α -APC-Cy7, TCR β -PE, CD19-PerCPy5.5, OVA-pentamer-APC and TCR $\nu\beta$ 12-FITC to discriminate EG.7-OVA tumor cells. All data were collected on a FACS Aria Fusion (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (FlowJo v.X software (BD, Ashland, OR, USA)).

Quantitative RT-PCR

Quantitative RT-PCR Total RNA from tumors 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 X) were all designed over different exons to prevent amplification of genomic DNA. Gapdh gene was used as the reference gene. Real-time PCR was performed

using the Eco Real-Time PCR System (Illumina). Gene expression was normalized using glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and expressed in arbitrary units using the $2^{-\Delta \Delta C_t}$ method ((31)).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed by GraphPad Prism 7 (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 unpaired Student's t test. Comparison of multiple conditions was done with one-way ANOVA tests. Differences in gene expression between responder and progressors groups were assessed using the unpaired t-test when normality assumption was met.

References.

1. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*. 2018;359:1350–5.
2. Benci JL, Xu B, Qiu Y, Wu TJ, Dada H, Twyman-Saint Victor C, et al. Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade. *Cell*. 2016;167:1540-1554.e12.
3. Pitt JM, Vétizou M, Daillère R, Roberti MP, Yamazaki T, Routy B, et al. Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors. *Immunity*. 2016;44:1255–69.
4. Syn NL, Teng MWL, Mok TSK, Soo RA. De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. *The Lancet Oncology*. 2017;18:e731–41.
5. Segovia M, Russo S, Girotti MR, Rabinovich GA, Hill M. Role of inflammasome activation in tumor immunity triggered by immune checkpoint blockers. *Clin Exp Immunol*. 2020;200:155–62.
6. Hill M, Segovia M, Russo S, Girotti M, Rabinovich GA. The Paradoxical Roles of Inflammation during PD-1 Blockade in Cancer. *Trends Immunol*. 2020;41:982–93.
7. Freeman TL, Swartz TH. Targeting the NLRP3 Inflammasome in Severe COVID-19. *Front Immunol*. 2020;11:1518.
8. Segovia M, Louvet C, Charnet P, Savina A, Tilly G, Gautreau L, et al. Autologous Dendritic Cells Prolong Allograft Survival Through *Tmem176b* - Dependent Antigen Cross-Presentation: Immunoregulatory Mechanisms of Autologous DCs. *American Journal of Transplantation*. 2014;14:1021–31.

9. Eon Kuek L, Leffler M, Mackay GA, Hulett MD. The MS4A family: counting past 1, 2 and 3. *Immunol Cell Biol.* 2016;94:11–23.
10. Louvet C, Chiffolleau E, Heslan M, Tesson L, Heslan J-M, Brion R, et al. Identification of a New Member of the CD20/FcepsilonRIbeta Family Overexpressed in Tolerated Allografts. *American Journal of Transplantation.* 2005;5:2143–53.
11. Condamine T, Le Texier L, Howie D, Lavault A, Hill M, Halary F, et al. Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2010;88:507–15.
12. Villani A-C, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science.* 2017;356:eaah4573.
13. Bourdely P, Anselmi G, Vaivode K, Ramos RN, Missolo-Koussou Y, Hidalgo S, et al. Transcriptional and Functional Analysis of CD1c+ Human Dendritic Cells Identifies a CD163+ Subset Priming CD8+CD103+ T Cells. *Immunity.* 2020;53:335-352.e8.
14. Brown CC, Gudjonson H, Pritykin Y, Deep D, Lavallée V-P, Mendoza A, et al. Transcriptional Basis of Mouse and Human Dendritic Cell Heterogeneity. *Cell.* 2019;179:846-863.e24.
15. Segovia M, Russo S, Jeldres M, Mahmoud YD, Perez V, Duhalde M, et al. Targeting TMEM176B Enhances Antitumor Immunity and Augments the Efficacy of Immune Checkpoint Blockers by Unleashing Inflammasome Activation. *Cancer Cell.* 2019;35:767-781.e6.

16. Rathinam VAK, Fitzgerald KA. Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. *Cell*. 2016;165:792–800.
17. Liu Z, An H, Song P, Wang D, Li S, Chen K, et al. Potential targets of TMEM176A in the growth of glioblastoma cells. *OTT*. 2018;Volume 11:7763–75.
18. Sun L, Zhang Y, Zhang C. Distinct expression and prognostic value of MS4A in gastric cancer. *Open Medicine*. 2018;13:178–88.
19. Theisen DJ, Davidson JT, Briseño CG, Gargaro M, Lauron EJ, Wang Q, et al. WDFY4 is required for cross-presentation in response to viral and tumor antigens. *Science*. 2018;362:694–9.
20. Alloatti A, Rookhuizen DC, Joannas L, Carpier J-M, Iborra S, Magalhaes JG, et al. Critical role for Sec22b-dependent antigen cross-presentation in antitumor immunity. *J Exp Med*. 2017;214:2231–41.
21. Savina A, Jancic C, Hugues S, Guermonprez P, Vargas P, Moura IC, et al. NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell*. 2006;126:205–18.
22. Jancic C, Savina A, Wasmeier C, Tolmachova T, El-Benna J, Dang PM-C, et al. Rab27a regulates phagosomal pH and NADPH oxidase recruitment to dendritic cell phagosomes. *Nat Cell Biol*. 2007;9:367–78.
23. Savina A, Amigorena S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev*. 2007;219:143–56.
24. Savina A, Peres A, Cebrian I, Carmo N, Moita C, Hacohen N, et al. The Small GTPase Rac2 Controls Phagosomal Alkalinization and Antigen

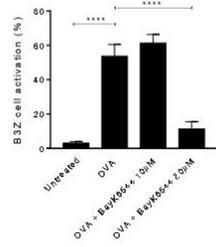
- Crosspresentation Selectively in CD8+ Dendritic Cells. *Immunity*. 2009;30:544–55.
25. Howland SW, Wittrup KD. Antigen Release Kinetics in the Phagosome Are Critical to Cross-Presentation Efficiency. *The Journal of Immunology*. 2008;180:1576–83.
 26. Lazaridou M, Christodoulou E, Nerantzaki M, Kostoglou M, Lambropoulou D, Katsarou A, et al. Formulation and In-Vitro Characterization of Chitosan-Nanoparticles Loaded with the Iron Chelator Deferoxamine Mesylate (DFO). *Pharmaceutics*. 2020;12:238.
 27. Cha J, Lee WB, Park CR, Cho YW, Ahn C-H, Kwon IC. Preparation and characterization of cisplatin-incorporated chitosan hydrogels, microparticles, and nanoparticles. *Macromol Res*. 2006;14:573–8.
 28. Torrecilla D, Lozano M V., Lallana E, Neissa JI, Novoa-Carballal R, Vidal A, et al. Anti-tumor efficacy of chitosan-g-poly(ethylene glycol) nanocapsules containing docetaxel: Anti-TMEFF-2 functionalized nanocapsules vs. non-functionalized nanocapsules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Elsevier B.V.; 2013;83:330–7.
 29. Segovia M, Louvet C, Charnet P, Savina A, Tilly G, Gautreau L. Europe PMC Funders Group Autologous Dendritic Cells Prolong Allograft Survival Through Tmem176b -Dependent Antigen Cross-Presentation. 2015;14:1021–31.
 30. Segovia M, Cuturi MC, Hill M. Preparation of mouse bone marrow-derived dendritic cells with immunoregulatory properties. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). United States; 2011;677:161–8.

31. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* (San Diego, Calif). United States; 2001;25:402–8.
32. Karttunen J, Sanderson S, Shastri N. Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89:6020–4.
33. Howland SW, Wittrup KD. Antigen Release Kinetics in the Phagosome Are Critical to Cross-Presentation Efficiency. *The Journal of Immunology*. 2008;180:1576–83.
34. Hoshyar N, Gray S, Han H, Bao G. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine* (London, England). 2016;11:673–92.
35. Fan W, Yan W, Xu Z, Ni H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. Netherlands; 2012;90:21–7.
36. Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20:101–24.
37. Marques C, Som C, Schmutz M, Borges O, Borchard G. How the Lack of Chitosan Characterization Precludes Implementation of the Safe-by-Design Concept. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:165.
38. Demaria O, Cornen S, Daëron M, Morel Y, Medzhitov R, Vivier E. Harnessing innate immunity in cancer therapy. *Nature*. 2019;574:45–56.

39. Rodell CB, Arlauckas SP, Cuccarese MF, Garris CS, Li R, Ahmed MS, et al. TLR7/8-agonist-loaded nanoparticles promote the polarization of tumour-associated macrophages to enhance cancer immunotherapy. *Nat Biomed Eng.* 2018;2:578–88.
40. Luo M, Wang H, Wang Z, Cai H, Lu Z, Li Y, et al. A STING-activating nanovaccine for cancer immunotherapy. *Nature Nanotech.* 2017;12:648–54.
41. Shae D, Becker KW, Christov P, Yun DS, Lytton-Jean AKR, Sevimli S, et al. Endosomolytic polymersomes increase the activity of cyclic dinucleotide STING agonists to enhance cancer immunotherapy. *Nat Nanotechnol.* 2019;14:269–78.
42. Gong N, Zhang Y, Teng X, Wang Y, Huo S, Qing G, et al. Proton-driven transformable nanovaccine for cancer immunotherapy. *Nat Nanotechnol.* 2020;15:1053–64.

Figure 1

A



B

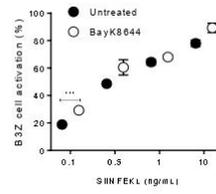


Figure 2

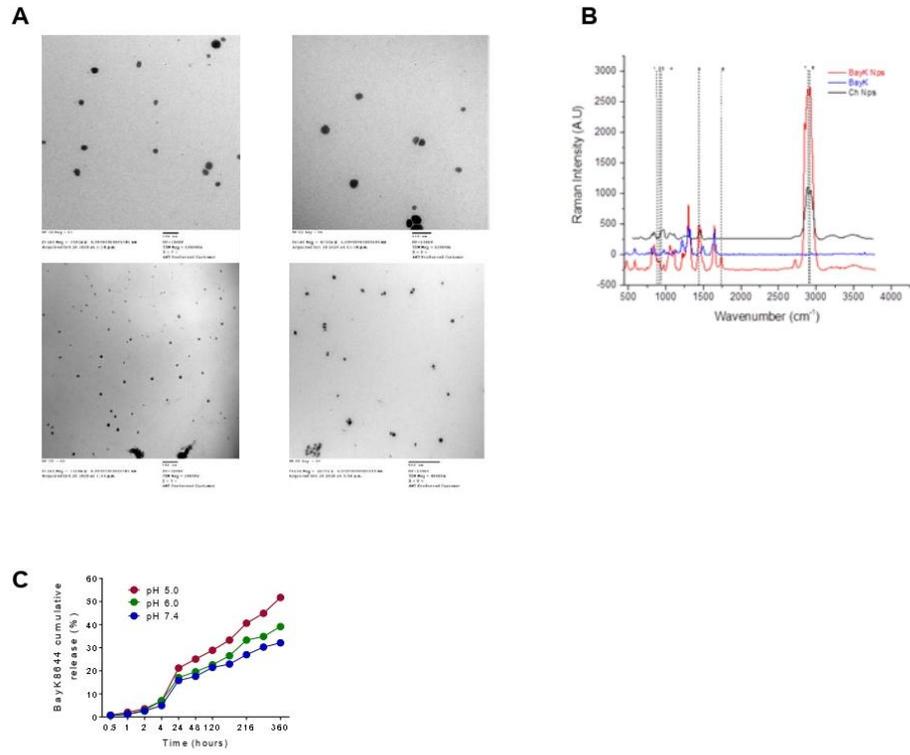


Figure 3

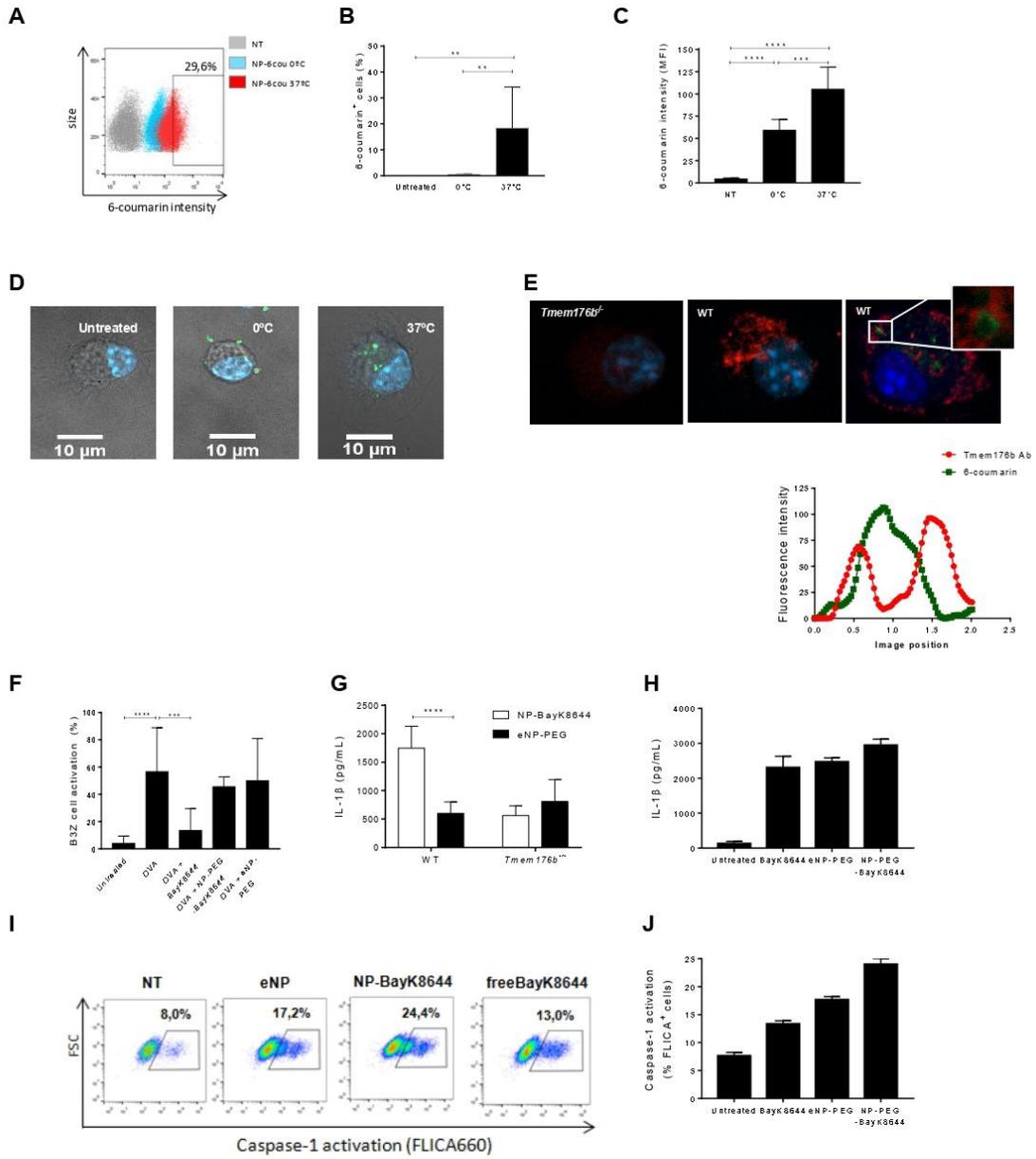


Figure 4

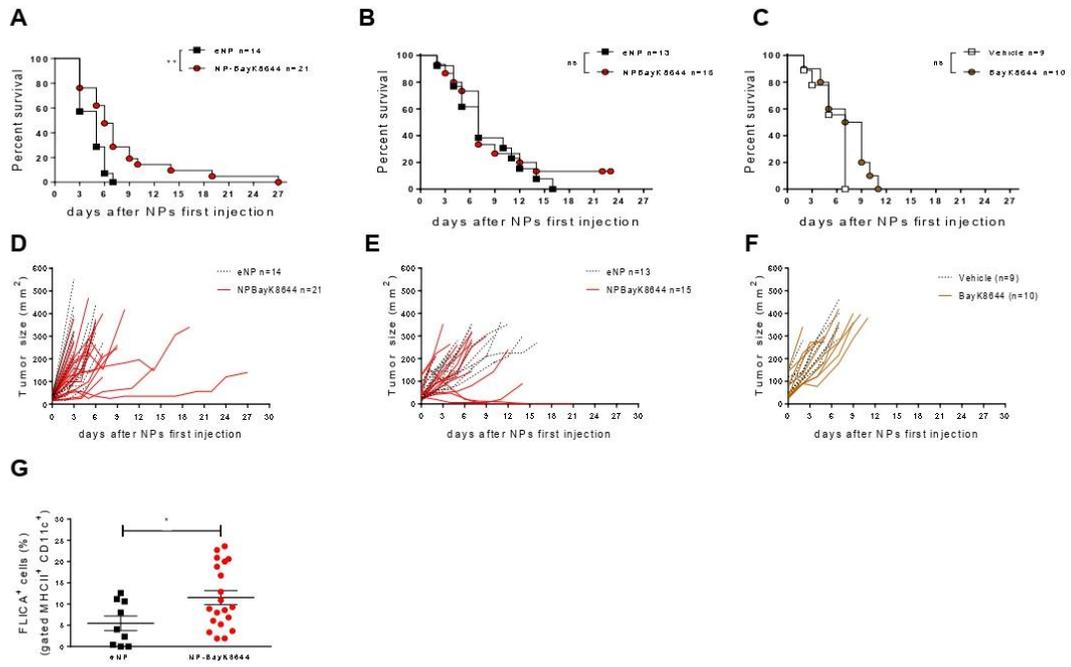
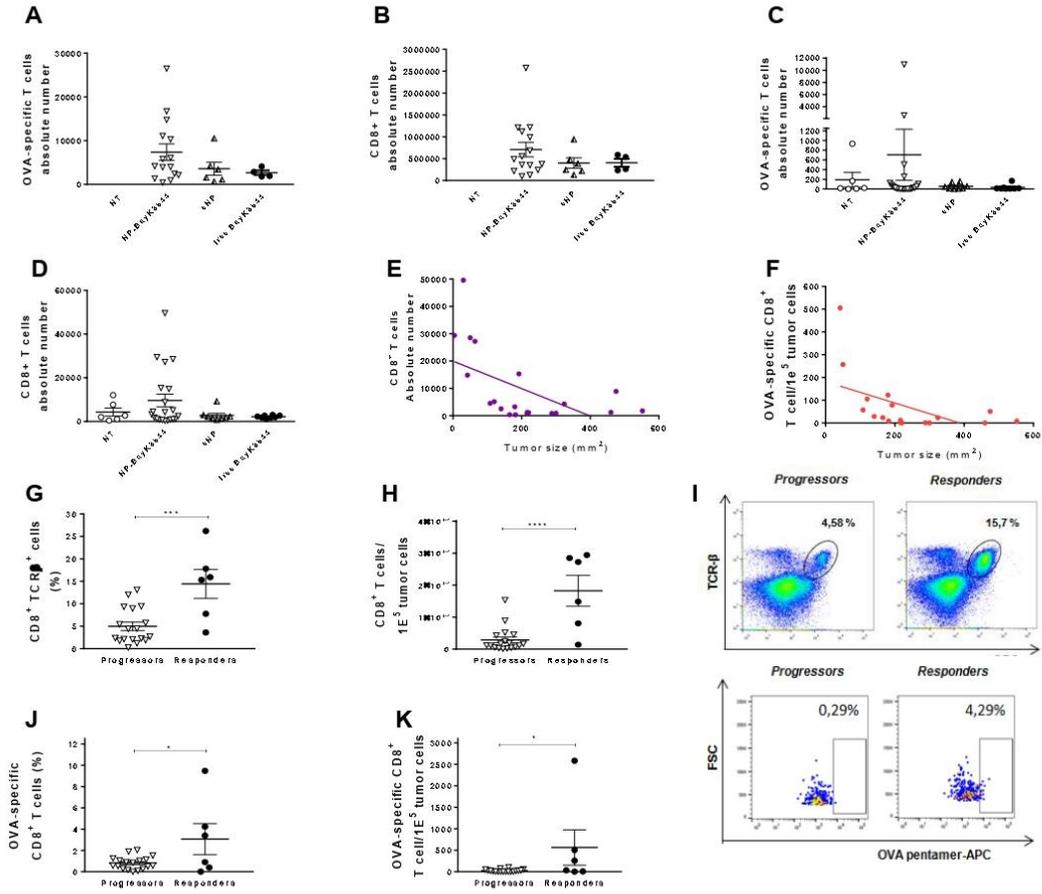


Figure 5



Anexo 2

Cancer Cell

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

Highlights

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

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-1 β cleavage by controlling cytosolic Ca^{2+} in dendritic cells and macrophages. Inhibition of TMEM176B enhances tumor infiltration by CD8⁺ T cells and improves the antitumor activity of immune checkpoint blockers.



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

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

¹Laboratory of Immunoregulation and Inflammation, Institut Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay

²Immunobiology Department, Faculty of Medicine, University of the Republic, 11800 Montevideo, Uruguay

³Laboratories 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

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

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

⁶Xenothera, 44093 Nantes, France

⁷Molecular Immunity Unit, Department of Medicine, University of Cambridge, CB2 0QH Cambridge, UK

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

⁹These authors contributed equally

¹⁰These authors contributed equally

¹¹Lead Contact

*Correspondence: ccuturi@nantes.inserm.fr (M.C.C.), 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⁺ 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 β 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⁺ 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

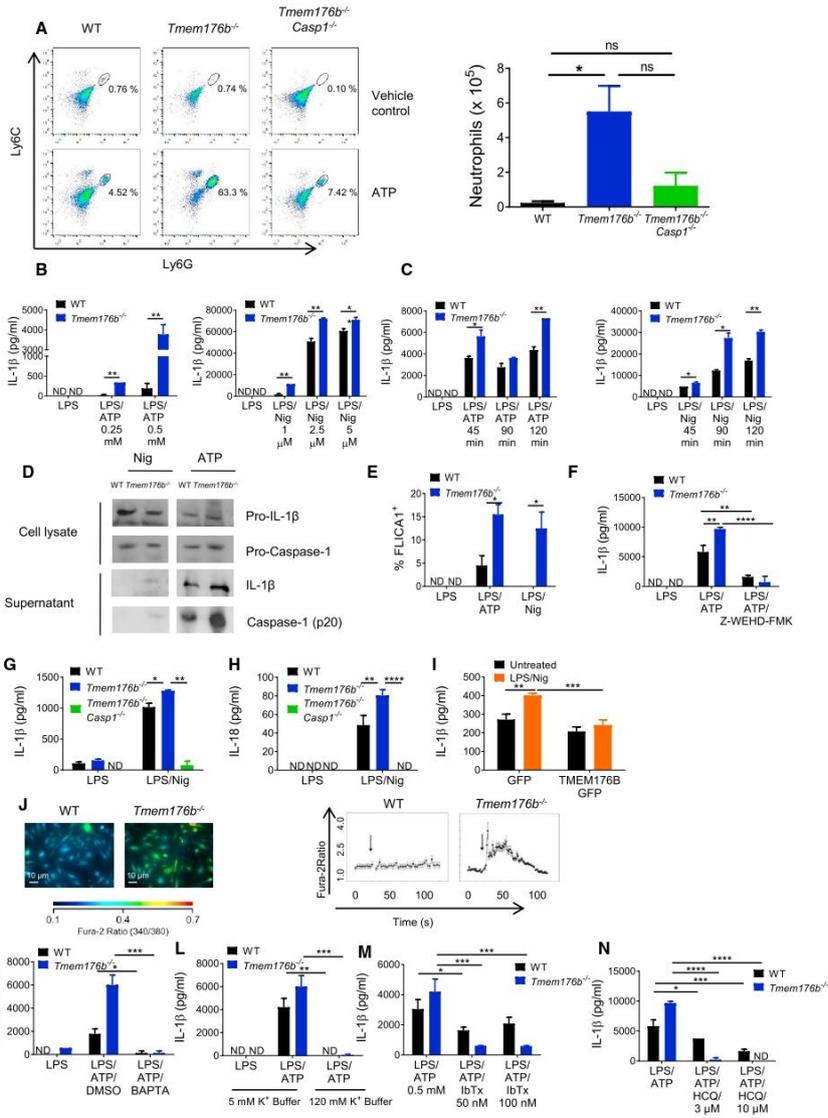
Blockade of immune checkpoints, including the cytotoxic T lymphocyte-associated protein (CTLA)-4 and the programmed cell death-1 (PD-1)/PD ligand-1 (PD-L1) pathway, have increased overall survival and progression-free survival of cancer patients.

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⁺ leads to T cell dysfunction by inhibiting voltage and Ca²⁺-dependent K⁺ 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⁺ 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⁺ 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 β (IL-1 β) 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 β through modulation of inflammasome activation (Gong et al., 2018). Interestingly, activation of the NLRP3 inflammasome following immunogenic chemotherapy sensitizes tumors to immune checkpoint blockers (Pfirsche 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⁺ dendritic cells (DCs) (Condamine et al., 2010). Here we explored the role of TMEM176B in inflammasome regulation, T cell-dependent antitumor 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*^{-/-} 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*^{-/-} 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*^{-/-}*Casp1*^{-/-} double knockout (DKO) mice (Figure S1A). Peritoneal neutrophil recruitment was almost completely inhibited in *Tmem176b*^{-/-}*Casp1*^{-/-} compared with *Tmem176b*^{-/-} animals (Figure 1A). ATP-induced neutrophil recruitment in *Tmem176b*^{-/-} mice was also interrupted by injection of a caspase-1 inhibitor (Figure S1B). We then stimulated WT and *Tmem176b*^{-/-} bone marrow-derived DCs (BMDCs) with the well-established NLRP3 activators ATP and nigericin and determined IL-1 β in culture supernatants as a readout of inflammasome activation. We observed that, for both stimuli, *Tmem176b*^{-/-} BMDCs secreted significantly higher levels of IL-1 β 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 β was more abundant in culture supernatants from *Tmem176b*^{-/-} BMDCs compared with those obtained from WT cells (Figure 1D). Moreover, we observed increased mature caspase-1 in supernatants from *Tmem176b*^{-/-} BMDCs compared with WT cells when stimulated with ATP (Figure 1D). Although lower doses (2.5 μ 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⁺ Ly6C^{int} Ly6G⁺) in peritoneal lavage 4 h after intraperitoneal (i.p.) injection with vehicle control (PBS) or 20 mg/kg ATP. In the plots, CD11b⁺ 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*^{-/-} bone marrow-derived DCs (BMDCs) treated with LPS (0.25 μ g/mL) for 4 h, washed and treated with ATP (left) or nigericine (Nig) (right). IL-1 β 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 β and pro-caspase-1 (lysates) or IL-1 β and caspase-1 (supernatants) in WT and *Tmem176b*^{-/-} BMDCs stimulated with LPS as in (B and C) and then treated for 90 min with 2.5 μ M Nig or 0.5 mM ATP. One experiment representative of three is shown.

(E) Caspase-1 activation in WT and *Tmem176b*^{-/-} BMDCs treated with LPS and then exposed to 0.5 mM ATP or 2.5 μ 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 β secretion by WT and *Tmem176b*^{-/-} BMDCs treated as in (E) compared with those treated with 10 μ 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 β (G) and IL-18 (H) by ELISA in culture supernatants from WT, *Tmem176b*^{-/-}, and *Tmem176b*^{-/-}*Casp1*^{-/-} 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 β in culture supernatants of THP-1-differentiated macrophages expressing GFP or GFP-TMEM176B untreated or treated for 3 h with 0.25 μ g/mL LPS and then for 2 h with 2.5 μ 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*^{-/-} BMDCs treated for 3 h with 0.25 μ g/mL LPS and 0.5 mM ATP. Cells were loaded with Ca²⁺-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 μ m.

(K) Determination of IL-1 β in BMDCs exposed to the NLRP3 inflammasome activator ATP as described in (E) in the presence or absence of the intracellular Ca²⁺ chelator BAPTA (100 μ M) or DMSO vehicle control. One experiment representative of three is shown. **p* < 0.05; two-way ANOVA test.

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

(M and N) Determination of IL-1 β in BMDCs following inflammasome activation in the presence or absence of the Ca²⁺-activated K⁺ 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*^{-/-} but not WT BMDCs (Figure 1D), higher doses (5 μ 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*^{-/-} BMDCs (Figure 1E), suggesting that caspase-1 may contribute to mature IL-1 β secretion by *Tmem176b*^{-/-} BMDCs. To confirm these findings, we induced inflammasome activation in WT and *Tmem176b*^{-/-} BMDCs in the presence or absence of a caspase-1 inhibitor and found that IL-1 β secretion was completely inhibited when caspase-1 activation was interrupted (Figure 1F). Moreover, IL-1 β secretion was completely abrogated in *Tmem176b*^{-/-} *Casp1*^{-/-} BMDCs (Figure 1G). Thus, increased IL-1 β secretion observed as a result of *Tmem176b* deficiency requires intact caspase-1 activity. Moreover, *Tmem176b*^{-/-} 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 β 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 β 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 Ca²⁺

TMEM176B is an endophagosomal non-selective monovalent cation channel (Segovia et al., 2014). Because the NLRP3 inflammasome is tightly regulated by cytosolic K⁺ (Muñoz-Planillo et al., 2013) and Ca²⁺ (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 Ca²⁺ levels in WT and *Tmem176b*^{-/-} BMDCs stimulated with ATP. BMDCs lacking *Tmem176b* showed greater cytosolic Ca²⁺ as compared with WT BMDCs (Figure 1J). Interestingly, intracellular Ca²⁺ chelation completely blocked IL-1 β secretion in WT and *Tmem176b*^{-/-} BMDCs (Figure 1K). This effect was also dependent on K⁺ efflux in WT and *Tmem176b*^{-/-} BMDCs (Figure 1L).

We recently showed that Ca²⁺-activated K⁺ channels are involved in ATP-triggered inflammasome activation (Schroeder et al., 2017). We therefore inhibited Ca²⁺-activated K⁺ channels in ATP-treated WT and *Tmem176b*^{-/-} BMDCs and determined the amounts of IL-1 β in culture supernatants. Inhibition of channel function using iberiotoxin or hydroxychloroquine (Schroeder et al., 2017) led to dose-dependent reduction in IL-1 β secretion by WT BMDCs. Interestingly, IL-1 β secretion

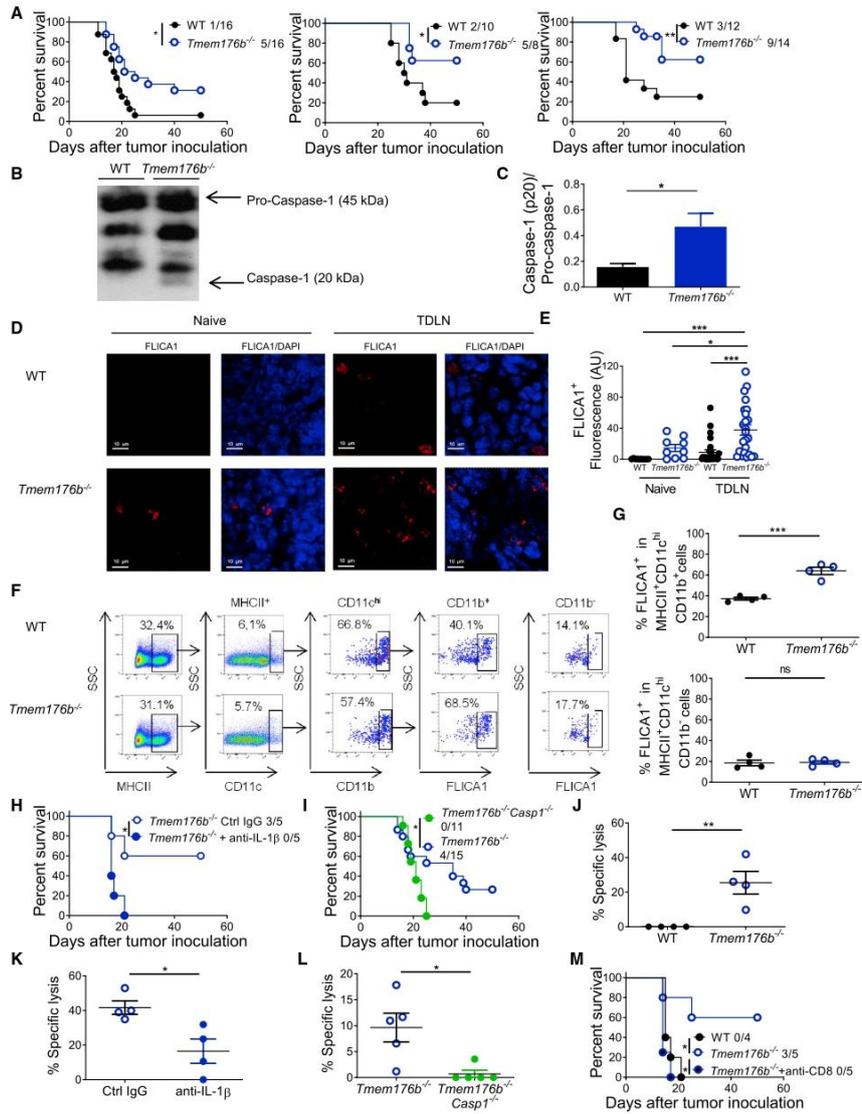
by *Tmem176b*^{-/-} BMDCs was completely abrogated by both inhibitors at doses that partially inhibited IL-1 β secretion in WT BMDCs (Figures 1M and 1N). Thus, heightened inflammasome activation in *Tmem176b*^{-/-} BMDCs is highly dependent on Ca²⁺-activated K⁺ channels. These results suggest that TMEM176B impairs ATP-induced cytosolic Ca²⁺ accumulation, preventing Ca²⁺-dependent K⁺ channel-driven inflammasome activation.

Lack of *Tmem176b* Restrains Tumor Growth in an IL-1 β - 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*^{-/-} mice inoculated with MC38 (colon), LL2 (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*^{-/-} animals did not show enhanced *in vivo* cytotoxicity against WT cells compared with tumor-bearing *Tmem176b*^{+/+} mice (Figure S2F), suggesting that tumor-associated TMEM176B is not immunogenic in *Tmem176b*^{-/-} 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*^{-/-} mice (Figure S2G). However, we found increased caspase-1 activation in tumor-draining lymph nodes (TDLN) from *Tmem176b*^{-/-} mice compared with WT animals (Figures 2B–2E). Moreover, flow cytometry analysis revealed augmented caspase-1 activation in resident CD11c^{hi} MHC II⁺ CD11b⁺ classical DCs (cDCs) in TDLN from *Tmem176b*^{-/-} 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^{hi} MHC II⁺ CD11b⁺ cDCs expressed considerable amounts of TMEM176B (Croizat et al., 2011) and TDLN contained higher frequency of CD11b⁺ TMEM176B⁺ cells compared with lymph nodes from naive animals (Figure S2I).

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



(legend on next page)

frequency of functional TCR β^+ CD4 $^+$ ROR γ 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 β and studied EG7 tumor development. Treatment with anti-IL-1 β -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 β^+ 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 β 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 degradation 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 β pathway. This mechanism is associated with inflammasome-dependent induction of TCR β^+ CD4 $^+$ ROR γ 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 β - and caspase-1-Dependent Manner

(A) Survival of WT and *Tmem176b* $^{-/-}$ mice injected subcutaneously with MC38 colon cancer cells (1×10^5 ; left graph), LL2 lung cancer cells (1×10^5 ; central graph), or EG7 thymic lymphoma cells (1×10^5 ; 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 μ 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 β 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 β 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.

772 Cancer Cell 35, 767–781, May 13, 2019

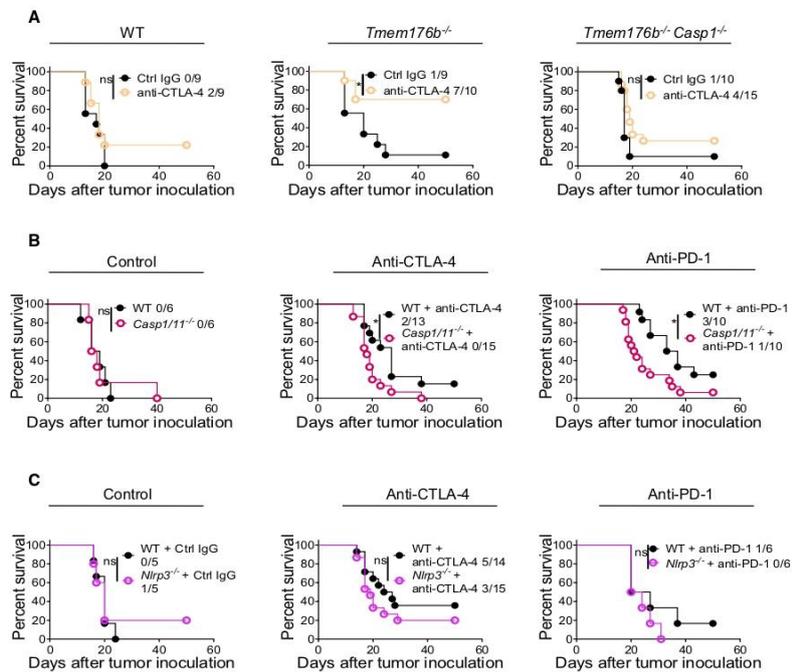


Figure 3. Inflammasome Activation Reinforces Immune Checkpoint Blockade
 (A) Survival of WT, *Tmem176b*^{-/-}, and *Tmem176b*^{-/-} *Casp1*^{-/-} mice inoculated with EG7 tumor cells and receiving anti-CTLA-4 or control IgG antibodies. *p < 0.05; log rank (Mantel-Cox) test.
 (B and C) Survival of WT and *Casp1/11*^{-/-} (B) or *Nlrp3*^{-/-} (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

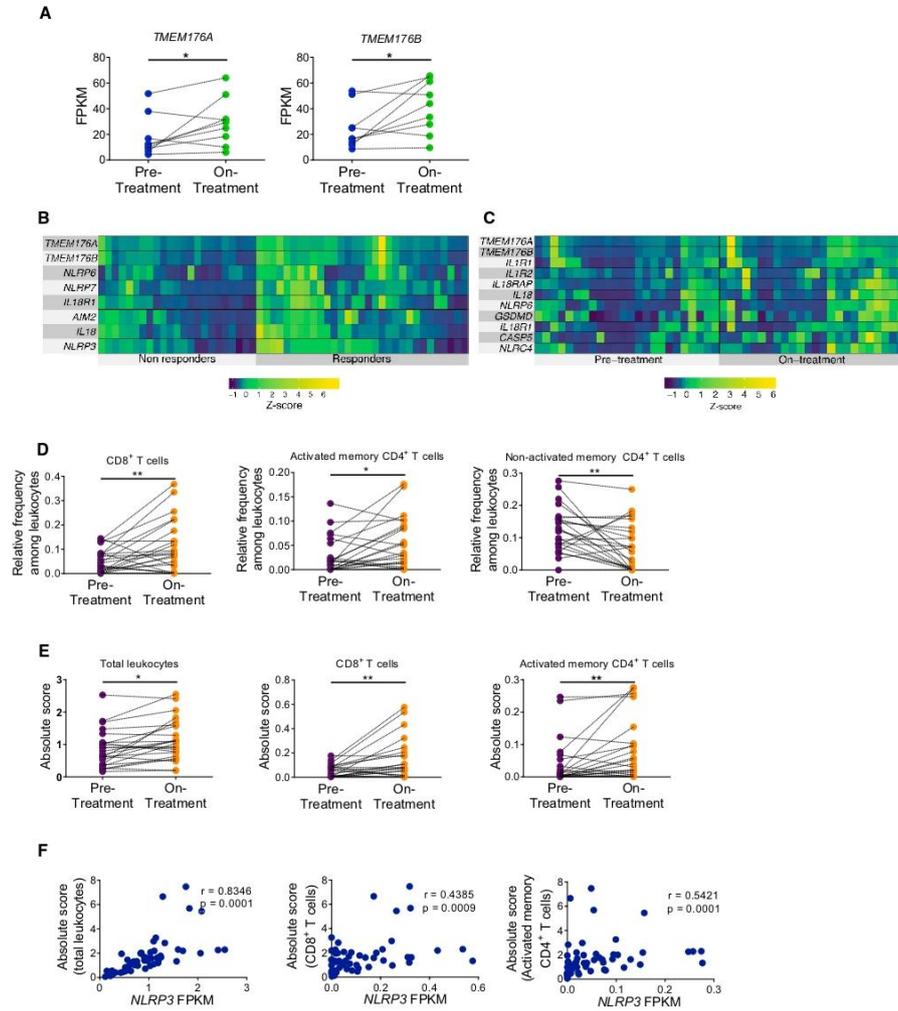


Figure 4. Analysis of the Inflammasome Signature in Tumor Biopsies from Melanoma Patients Treated with Immune Checkpoint Blockers
 (A) Paired analysis comparing pre-treatment versus on-treatment melanoma biopsies of patients who did not respond to anti-PD-1 therapy and were not treated previously with 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⁺ T cells and activated memory CD4⁺ T cells during anti-PD-1 treatment versus pre-treatment in responders but not in progressors (Figure 4D). Absolute number of leukocytes, CD8⁺ T cells, and activated memory CD4⁺ 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⁺ T cells and activated memory CD4⁺ 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⁺-sensitive fluorescent dye Asante NaTRIUM Green 2 (ANG-2). We observed increased ANG-2 mean fluorescence intensity in mCherry⁺ compared with mCherry⁻ 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⁺ 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 Ca²⁺ 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⁺ influx through the modulation of Ca²⁺ 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.

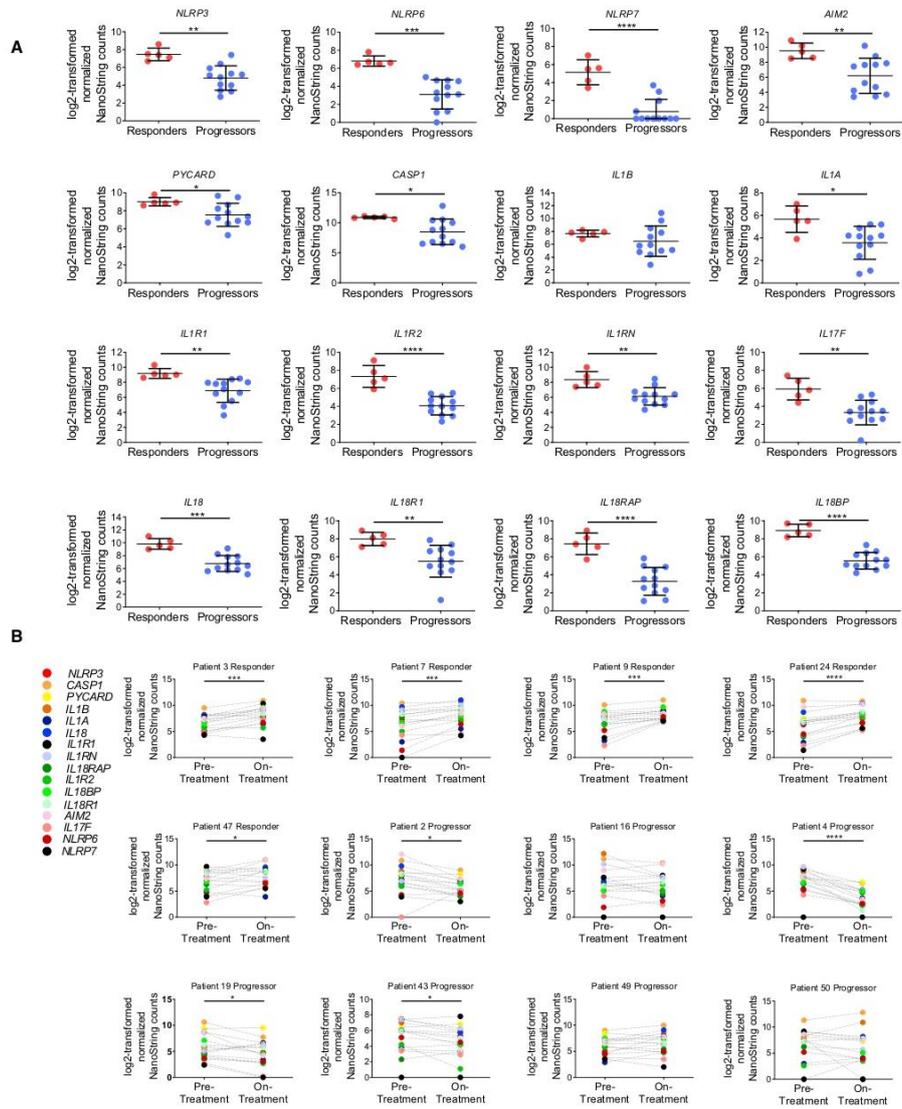
We found that BayK8644 induced IL-1 β secretion and caspase-1 activation in LPS-primed WT but not in *Tmem176b*^{-/-} BMDCs (Figures 6C and S8B–S8D). Interestingly, BayK8644-induced IL-1 β secretion was inhibited by the Ca²⁺-activated K⁺ channel (KCa) inhibitors tetraethylammonium and hydroxychloroquine (Figure 6D). Thus, BayK8644 treatment on WT BMDCs phenocopied *Tmem176b* deficiency. In THP-1-differentiated macrophages, TMEM176B-dependent inhibition of IL-1 β 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*^{-/-} 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⁺ T cells and activated memory CD4⁺ 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*^{-/-} 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*^{-/-} tumor-bearing mice (Figure 6G). Consistent with this observation, BayK8644 increased the frequency of CD11b⁺ cDCs expressing active caspase-1 in TDLN (Figure 6H). Moreover, BayK8644-induced tumor control was mediated by CD8⁺ T cells as it increased CD8⁺ T cell-dependent tumor cytotoxicity *in vivo* (Figure 6I), and depletion of CD8⁺ 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⁺ T cell-dependent manner, phenocopying *Tmem176b*^{-/-} 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 antitumor 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⁺ CD4⁺ RORγt⁺ T cells in TDLN (Figure S8I) and increased frequency of tumor-specific CD8⁺ T cells within the tumor microenvironment (Figure 6M) compared with anti-PD-1 monotherapy. Depletion of CD8⁺ T cells in mice treated with anti-PD-1 plus BayK8644 abrogated antitumor immunity (Figure 6N). This observation might be explained by concomitant CTL-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⁺ T cell compartment. Furthermore, BayK8644 significantly enhanced the antitumor effect of anti-PD-1 therapy in mice bearing 5555 melanoma (Figure 6O), whereas this effect was apparent in LL2 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⁺ T cell-dependent antitumor immunity.

DISCUSSION

In this study, we demonstrate a central role of the inflammasome in reinforcing CD8⁺ 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).

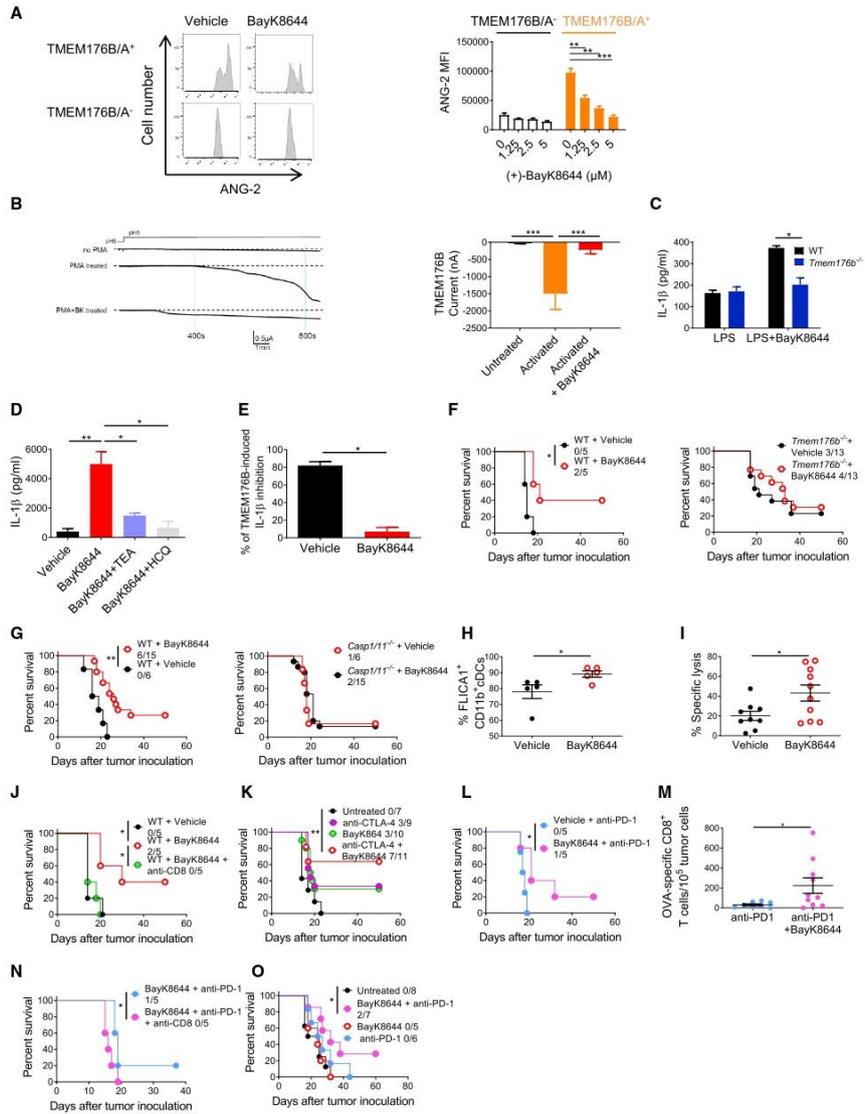
Although recently proposed to play a role in immunotherapy (Mangan et al., 2018), the direct contribution of IL-1β/IL-18 inflammasomes to antitumor immunity and adaptive checkpoint blockade remains elusive (Karki et al., 2017). Here we identify a therapeutic strategy that reinforces antitumor responses 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*^{-/-} 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 antitumor 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*^{-/-} and *Tmem176b*^{-/-}*Casp1*^{-/-} 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) Log2-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 ^a	150 ± 18 ^b	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

^aValues before injection of vehicle control or BayK8644.

^bMean ± 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⁺ efflux through the voltage-gated (K_v1.3) or Ca²⁺-activated (KCa3.1) K⁺ channels has been shown to reinvigorate tumor-infiltrating T cells (Eil et al., 2016). The results presented here suggest that Ca²⁺-induced K⁺ 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 antitumor 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*^{-/-} 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*^{-/-} (F) or *Casp1/11*^{-/-} (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⁺ 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⁺⁺ 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.

780 Cancer Cell 35, 767–781, May 13, 2019

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.L., 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., Guillems, 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 Hulet, 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⁺⁺-activated K⁺ 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 β 1/FAK signaling. *Cancer Cell* *27*, 574–588.
- Jerby-Arnon, L., Shah, P., Cucoco, M.S., Rodman, C., Su, M.-J., Melms, J.C., Lesson, 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., Keirnsse, J., Morias, Y., Van Overmeire, E., Geeraerts, X., Elkrim, Y., Kiss, M., Bolli, E., Lahmar, Q., Sichié, 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., Chiffoleau, 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/Fc ϵ 1 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., McColli, A., Hofer, A.M., and Horg, 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.
- Pflrschke, 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., Martin-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., Charney, 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., Furtas, 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
Antibodies		
Goat polyclonal anti-IL-1 β	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 β (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 α (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 β antibody (H-153)	Santa Cruz Biotechnologies	Cat# sc-7884 RRID:AB_2124476
ROR γ t (AFKJS-9)	eBiosciences	Cat# 17-6988 RRID:AB_1633425
TMEM176B Polyclonal Antibody	Proteintech	Cat# 19825-1-AP RRID:AB_10638313
Anti-LR8 (TMEM176B) antibody	Abcam	Cat# ab103929 RRID:AB_10712259
Biological Samples		
Colon cancer tissue array 90 tumor cases with survival information.	US Biomax, Inc	Cat# HCol-Ade180Sur-04
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
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-Adamanty)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
FLUCA 660 Caspase-1 Assay (FLUCA1)	Immunochemistry	Cat# 9122
SCREEN-WELL® Ion Channel ligand library	Enzo Life Sciences	Cat# BML-2805
Critical Commercial Assays		
Mouse IL-1 β ELISA	Biologend	Cat# 432603
Human IL-1 β 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
Deposited Data		
Bulk RNA expression data Riaz cohort	(Riaz et al., 2017)	https://github.com/riazn/bms038_analysis/tree/master/data
Normalized single cell expression data.	(Jerby-Amon et al., 2018)	GEO: GSE115978
Mendeley dataset		https://data.mendeley.com/datasets/publish-confirmation/gvj6fc2b8v/1
Normalized NanoString nCounter data	(Chen et al., 2016)	
Experimental Models: Cell Lines		
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
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse: C57BL/6J	Institut Pasteur Montevideo	N/A
Mouse: Balb/C	Institut Pasteur Montevideo	N/A
Mouse: <i>Tmem176b</i> ^{-1/-}	Cristina Cuturi's lab	N/A
Mouse: <i>Tmem176b</i> ^{+/+}	Cristina Cuturi's lab	N/A
Mouse: <i>Tmem176b</i> ^{-/-} <i>Casp1</i> ^{-/-}	This paper	N/A
Mouse: <i>Nlrp3</i> ^{-/-} (B6.129S6- <i>Nlrp3</i> ^{tm1Bnk/J})	The Jackson Laboratory	Cat# 021302 RRID:IMSR_JAX:021302
Mouse: <i>Casp1</i> ¹¹¹ ^{-/-} (B6N.129S2- <i>Casp1</i> ^{tm1Fiv/J})	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
C57BL/6NJ	The Jackson Laboratory	Cat# 005304 RRID:IMSR_JAX:005304
Oligonucleotides		
Primers for ROR γ t (mRNA) see Table S7	This paper	N/A
Primers for <i>Il17a</i> , see Table S7	This paper	N/A
Primers for <i>Foxp3</i> , see Table S7	This paper	N/A
Primers for <i>Tgfb1</i> , see Table S7	This paper	N/A
Primers for <i>Il10</i> , see Table S7	This paper	N/A
Primers for <i>Irfng</i> , see Table S7	This paper	N/A
Primers for <i>Tnfa</i> , see Table S7	This paper	N/A
Primers for <i>Ctla4</i> , see Table S7	This paper	N/A
Primers for <i>Ccl22</i> , see Table S7	This paper	N/A
Primers for <i>Ccl5</i> , see Table S7	This paper	N/A
Primers for <i>Il12</i> , see Table S7	This paper	N/A
Primers for <i>Il4</i> , see Table S7	This paper	N/A
Primers for <i>Gata3</i> , see Table S7	This paper	N/A
Primers for <i>Tbx21</i> , see Table S7	This paper	N/A
Primers for <i>Cebpb</i> , see Table S7	This paper	N/A
Primers for <i>Ccl19</i> , see Table S7	This paper	N/A
Primers for <i>Il6</i> , see Table S7	This paper	N/A
Primers for <i>Fas</i> , see Table S7	This paper	N/A
Primers for <i>Pdl1</i> , see Table S7	This paper	N/A
Primers for <i>Tmem176b</i> , see Table S7	This paper	N/A
Primers for <i>Gapdh</i> , see Table S7	This paper	N/A
Recombinant DNA		
pcDNA3.1-r <i>Tmem176b</i> -GFP	Cédric Louvet	N/A
pcDNA3.1GFP	José Badano	N/A
pSecTag2B-PS- <i>Tmem176b</i> -V5His	Cédric Louvet	N/A
pSecTag2b-PS-r <i>Tmem176b</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)	https://github.com/KrishnaswamyLab/MAGIC
CIBERSORT	(Newman et al., 2015)	https://cibersort.stanford.edu

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).

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^{-/-} 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*^{-/-} (B6.129S6-*Nlrp3*^{tm1Bnk/J}; 021302) and *Casp1*^{1/11}^{-/-} (B6N.129S2-*Casp1*^{tm1Fw/J}; 016621) were from Jackson Laboratory. *Nlrp3*^{-/-} animals were compared to 000664 C57BL/6J, and *Casp1*^{1/11}^{-/-} mice to 005304 C57BL/6NJ. *Tmem176b*^{-/-} *Casp1*^{1/11}^{-/-} mice were generated by microinjecting

e3 Cancer Cell 35, 767–781.e1–e6, May 13, 2019

Crispr/Cas9 targeting *Casp1* in *Tmem176b*^{-/-} embryos. F1 animals were genotyped and heterozygous mice were crossed to generate F2 homozygous *Tmem176b*^{-/-}*Casp1*^{-/-} animals. *Casp1* deficiency was confirmed by Western blot (Figure S1). All animal strains including *Tmem176b*^{-/-}, *Tmem176b*^{+/+} WT (issued from littermate controls), C57BL/6J, *Nlrp3*^{-/-}, C57BL/JN, *Casp1*^{+/+} and *Tmem176b*^{-/-}*Casp1*^{-/-} 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 1×10^5 MC38 colon cancer cells, 1×10^5 LL2 lung cancer cells, 2.5×10^5 5555 melanoma cells or 1×10^6 EG7 thymic lymphoma cells. BALB/C animals were injected with 1×10^5 CT26 colon cancer cells. Injection was performed alternating one WT and one *Tmem176b*^{-/-} 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 β , anti-IL-17A or control IgG were used, 4 μ 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⁺ T cells, 100 μ 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 μ 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 μ 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^{int} Ly6G^{hi} cells within the CD11b⁺ 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⁺CD11b⁺MHC II^{int}. Cells were stimulated for 3 hr with 0.25 μ g/ml LPS, washed and treated with the indicated doses of ATP or nigericin. The presence of IL-1 β 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 β (Santa Cruz Biotechnol, sc-7884) antibodies.

THP-1 Transfection and Inflammasome Activation

THP-1 monocytes were differentiated into macrophages by treatment with 0.1 μ M PMA for 48 hr. Macrophages (2.5×10^6) 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 μ g/ml LPS. Cells were washed and treated for 2 hr with 2.5 μ M nigericin.

METHOD DETAILS

Cytosolic Ca⁺⁺ Determination

BMDCs cultured on glass coverslips were loaded with 1 μ M Fura-2 (ratiometric Ca⁺⁺-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 μ M (low) DDAO-SE probe. The high DDAO population was loaded for 60 min at 37°C with 50 μ M SIINFEKL OVA peptide. After three washes, the high and low population were mixed at 1:1 ratio. The mixed cells (2×10^6) were injected i.v in WT, *Tmem176b*^{-/-} or *Tmem176b*^{-/-}*Casp1*^{-/-} 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 μM ANG-2 for 30 min at 37°C, washed and incubated in 140 mM Na⁺-containing phosphate buffer or 140 mM NMDG to substitute Na⁺ 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⁺-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 MgCl₂; 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 MgCl₂, 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 μM 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^{-ΔΔCt} 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). 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-Amon 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, Maria Cristina Cuturi, M. Romina Girotti, Gabriel A. Rabinovich, and Marcelo Hill

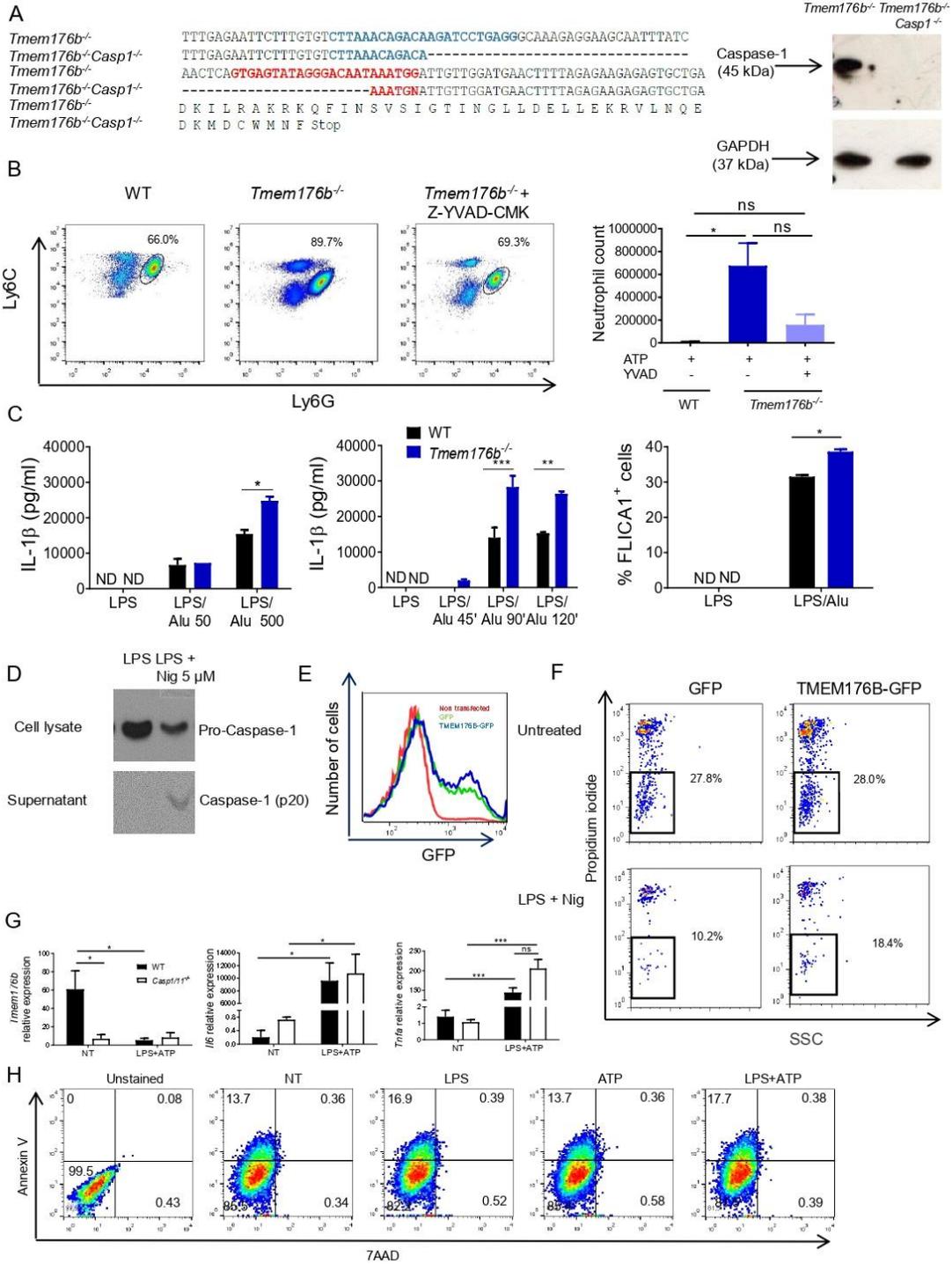


Figure S1. Related to Figure 1.

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

(B) Absolute number of neutrophils (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{int}) determined by flow cytometry in 6-8 weeks-old male WT and *Tmem176b*^{-/-} mice injected i.p with 20 mg/kg ATP. Four hr after ATP injection, peritoneal lavage was performed. In the plots, CD11b⁺ 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 β and Caspase-1 activation in WT and *Tmem176b*^{-/-} bone marrow-derived DCs (BMDCs) treated with LPS (0.25 μ g/ml) for 4 hr, washed and treated with 500 μ 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 β 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 μ 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 μ g/ml), washed and treated or not with 5 μ 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 μ 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 μ g/ml LPS and then exposed for 2 hr to 2.5 μ 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*^{-/-} BMDCs were left untreated (NT) or treated with LPS (0.25 μ 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.

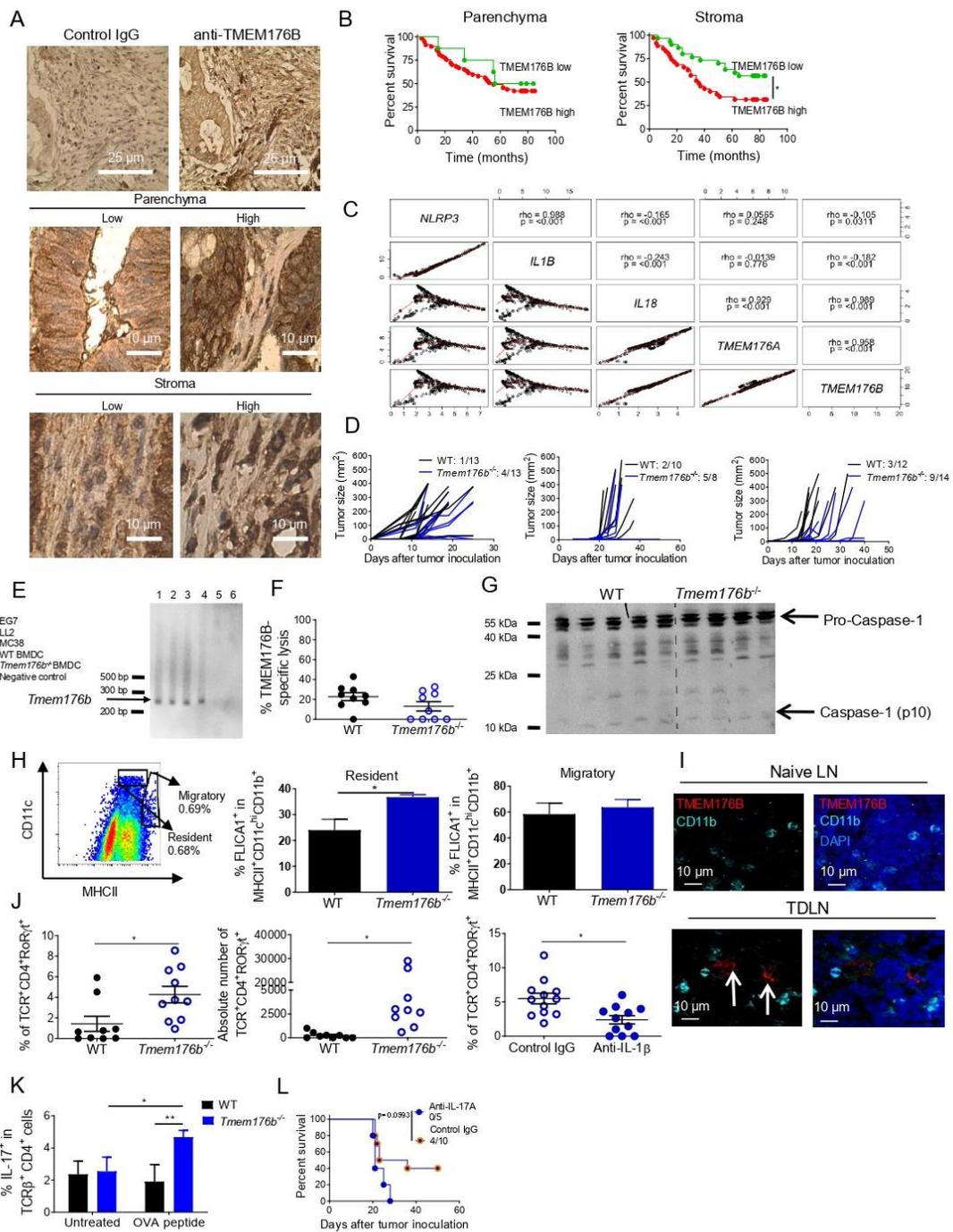


Figure S2. Related to Figure 2.

(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 μ 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 1×10^6 MC38 colon cancer cells (left), 1×10^5 LL2 lung cancer cells (center) or 1×10^6 EG7 thymic lymphoma cells (right) s.c injected into WT and *Tmem176b*^{-/-} 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*^{-/-} 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*^{-/-} 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⁺ cells (expressing active Caspase-1) within CD11b⁺ resident and migratory cDCs respectively from WT and *Tmem176b*^{-/-} animals. One experiment representative of two is shown. * p<0.05 Student's *t* test.

(I) Immunostaining of TMEM176B⁺ CD11b^{int} 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⁺ CD11b^{int} cells. At least three animals were studied in each group. Scale bars, 10 μ m.

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

(K) Flow cytometry of IL-17A⁺ CD4⁺ T cells in TDLN cells from EG7-bearing WT and *Tmem176b*^{-/-} 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⁺ CD4⁺ 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*^{-/-} mice treated with control IgG or anti-IL-17A neutralizing antibody. p=0.0593. Log-rank (Mantel-Cox) test.

Mean ± SD are shown.

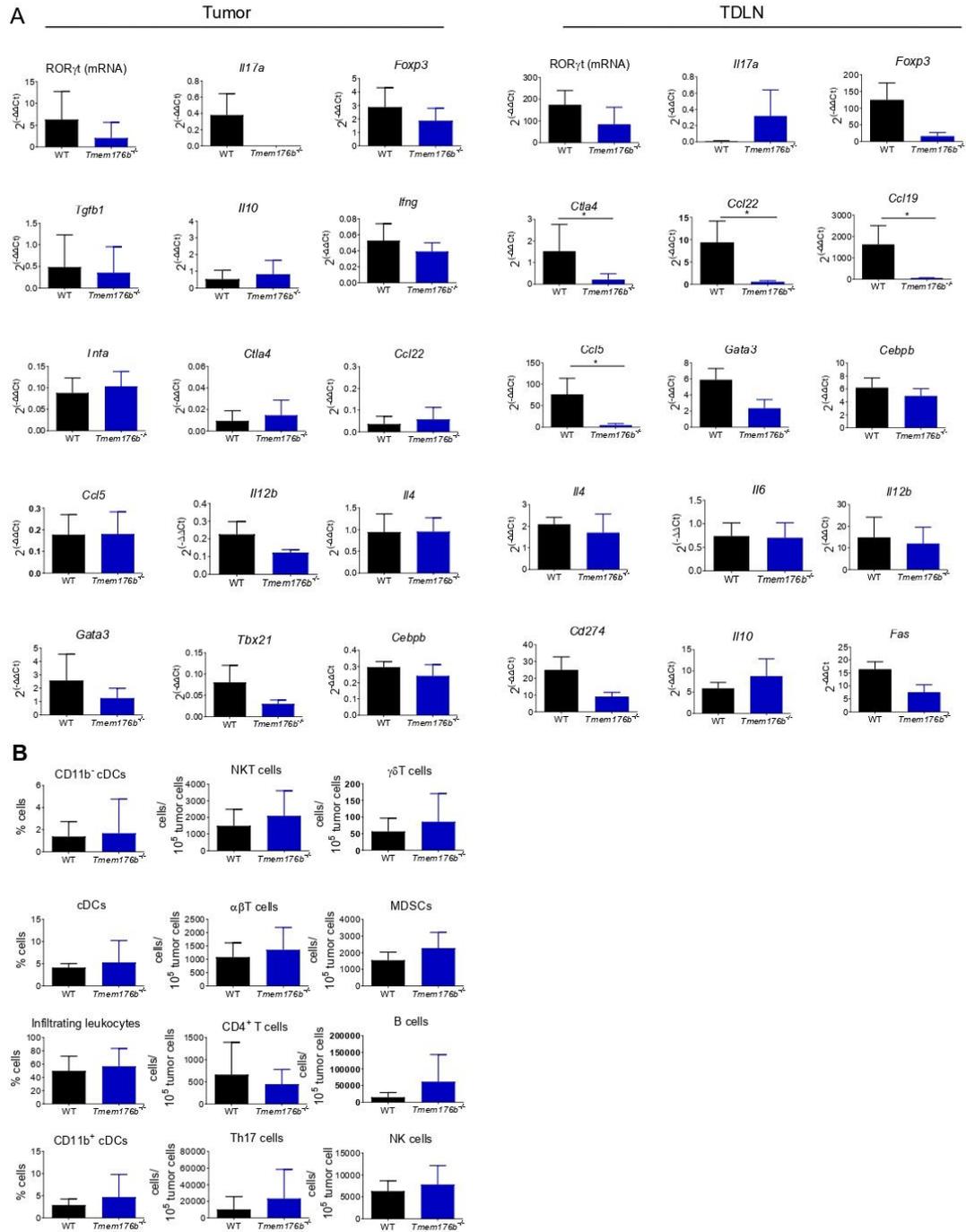


Figure S3. Related to Figure 2.

(A) Quantitative RT-PCR of the indicated transcripts in EG7 tumors and tumor-draining lymph nodes (TDLN) from WT and *Tmem176b*^{-/-} 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⁻ cDCs : TCRVβ12⁻ CD11c^{hi} MHC II⁺ CD11b⁻; cDCs: TCRVβ12⁻ CD11c^{hi} MHC II⁺; Infiltrating cells: TCRVβ12⁻ (EG7 cells are TCRVβ12⁺); CD11b⁺ cDCs: TCRVβ12⁻ CD11c^{hi} MHC II⁺ CD11b⁺; NKT cells: TCRVβ12⁻ TCRβ⁺ NK1.1⁺; αβT cells: TCRVβ12⁻ TCRβ⁺; CD4⁺ T cells: TCRVβ12⁻ TCRβ⁺ CD4⁺; Th17: TCRVβ12⁻ TCRβ⁺CD4⁺RORγt⁺; γδT cells :TCRVβ12⁻ TCRγδ⁺; MDSCs: TCRβ⁻ CD11b⁺ Gr1⁺; B cells: TCRVβ12⁻TCRβ⁻ CD19⁺; NK cells: TCRVβ12⁻ TCRβ⁻ NK1.1⁺. EG7 tumors from WT and *Tmem176b*^{-/-} 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.

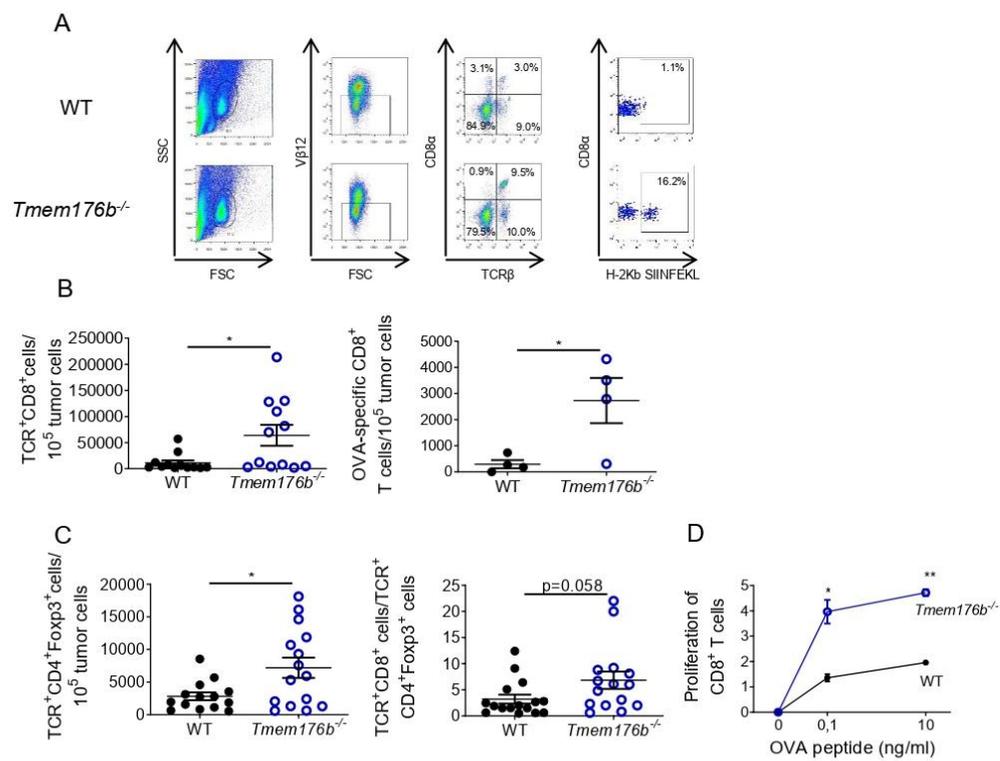


Figure S4. Related to Figure 2.

(A) Flow cytometry analysis of total and OVA (SIINFEKL peptide)-specific CD8⁺ T cells within the tumor microenvironment. TCRV β 12 staining was used to identify tumoral EG7 T cells. Representative of three experiments.

(B) Determination of the frequency of total and OVA-specific CD8⁺ T cells in WT and *Tmem176b*^{-/-} 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⁺ 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⁺ T cells was determined by flow cytometry by analyzing DDAO dilution. Four WT and four *Tmem176b*^{-/-} animals were studied. * p<0.05; ** p<0.01. Student's *t* test.

Mean \pm SD are shown.

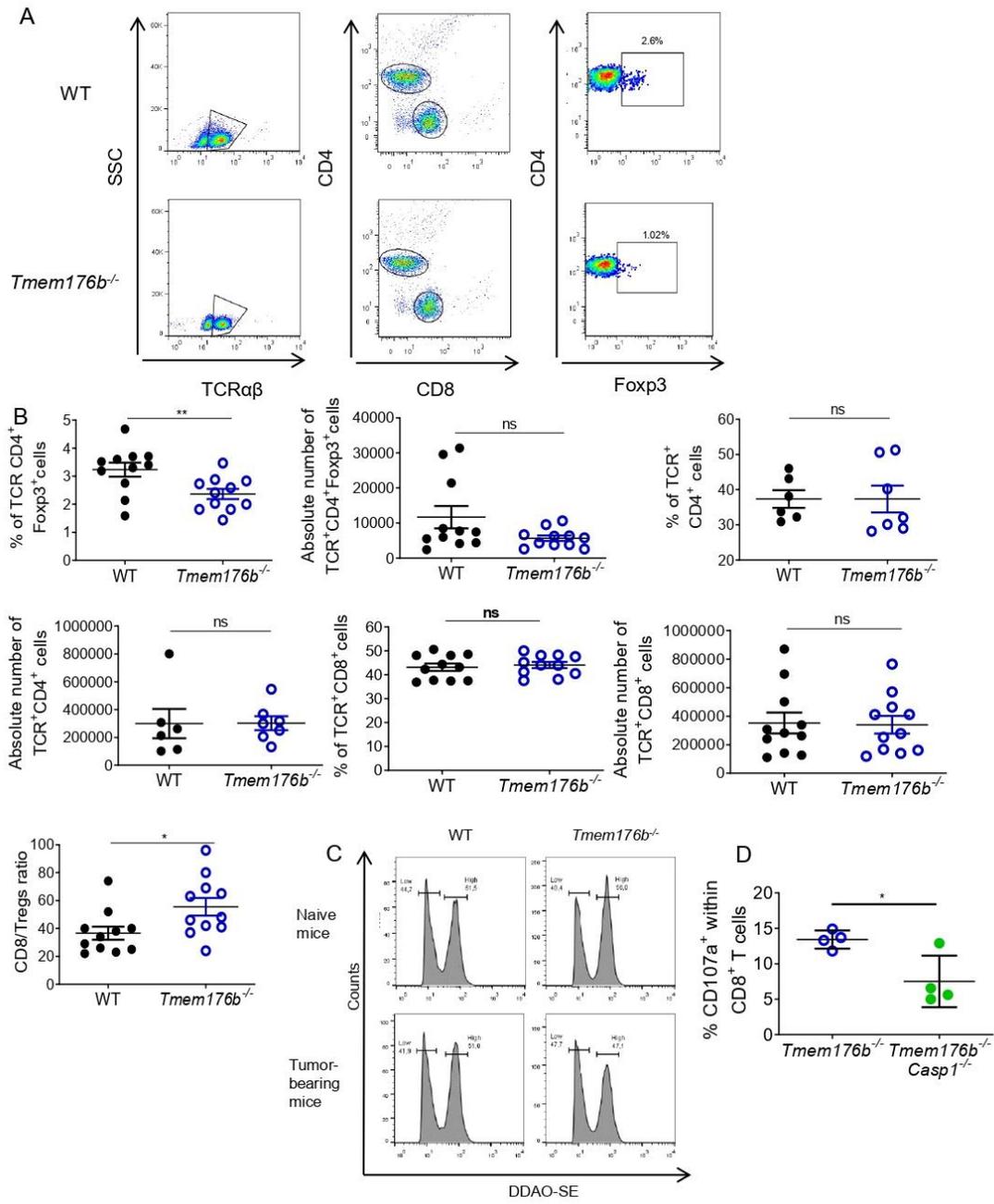


Figure S5. Related to Figure 2.

Tumor-draining lymph nodes from EG7-bearing WT and *Tmem176b*^{-/-} 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⁺ T cells infiltrating tumors in *Tmem176b*^{-/-} and *Tmem176b*^{-/-}*Casp1*^{-/-} 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 ^a	p_value_log2	fdr_log2
TMEM176B	0.0390625	0.46875	0.7567829	0.029506455	0.37796936
TMEM176A	0.0390625	0.46875	0.72357185	0.048297486	0.37796936
CASP4	0.06761715	0.46875	0.3790591	0.111900929	0.44760372
IL18R1	0.08848316	0.46875	-0.42848366	0.175189823	0.54545455
NLRP6	0.09765625	0.46875	0.64605376	0.09765625	0.44760372
IL1RN	0.12890625	0.4921875	0.66854228	0.062994893	0.37796936
IL1RAP	0.1640625	0.4921875	0.3397688	0.25	0.54545455
IL1R2	0.1640625	0.4921875	0.62915261	0.053073014	0.37796936
IL1B	0.203125	0.54166667	0.39703187	0.31477899	0.62955798
CASP5	0.25	0.54545455	0.32829776	0.220629385	0.54545455
NLRP12	0.25	0.54545455	-0.78174959	0.25	0.54545455
AIM2	0.359375	0.71875	0.3707348	0.214068788	0.54545455
PYCARD	0.43022486	0.79426128	-0.17641233	0.477043954	0.74553571
GSDMD	0.49609375	0.85044643	0.07568183	0.588683156	0.74553571
IL18RAP	0.58736276	0.86979167	0.32970506	0.577301487	0.74553571
SIRT3	0.65103296	0.86979167	-0.06294952	0.607275156	0.74553571
IL1A	0.65234375	0.86979167	-0.01555178	0.65234375	0.74553571
IL18	0.65234375	0.86979167	0.14703032	0.55410695	0.74553571
ABHD5	0.8916341	1	0.01940535	0.786760725	0.85828443
CASP1	0.91015625	1	0.20761326	0.604608002	0.74553571
IL1R1	0.93720565	1	-0.02012097	0.65234375	0.74553571
NLRP7	0.94418251	1	0.16525862	0.833634883	0.86987988
NLRC4	0.95868982	1	0.01288561	0.645871386	0.74553571
NLRP3	1	1	-0.12646354	0.901745055	0.90174505

a: $fc=FC=\text{Log}_2(\text{on-treatment}/\text{pre-treatment})$

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

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 ^a	p_value_log2	fdr_log2
IL1RAP	0.04919459	1	-0.84507093	0.068028757	0.97593334
CASP1	0.14290646	1	0.8346638	0.215221623	0.97593334
IL1R2	0.1895867	1	-0.27886838	0.189586695	0.97593334
ABHD5	0.2409666	1	0.28218828	0.336421084	0.97593334
NLRC4	0.25253619	1	0.57558152	0.427551872	0.97593334
PYCARD	0.28754702	1	0.786833	0.278688796	0.97593334
IL18R1	0.44913681	1	0.06558208	0.687783063	0.97593334
NLRP6	0.51709317	1	-0.31920005	0.517093172	0.97593334
IL1A	0.5180268	1	-1.37787825	0.518026796	0.97593334
AIM2	0.52539868	1	-1.62832169	0.285701311	0.97593334
IL1R1	0.66298319	1	0.20863927	0.525398683	0.97593334
NLRP3	0.69470252	1	0.02702505	0.694702525	0.97593334
IL1B	0.69470252	1	-1.04185706	0.694702525	0.97593334
GSDMD	0.69470252	1	-0.01225233	0.871411967	0.97593334
TMEM176A	0.73989814	1	-0.25420257	0.739898142	0.97593334
IL18RAP	0.73989814	1	0.22563589	0.739898142	0.97593334
NLRP12	0.73989814	1	1.41454798	0.739898142	0.97593334
CASP5	0.78594874	1	-0.32849091	0.78594874	0.97593334
NLRP7	0.92607981	1	-0.18311634	0.926079813	0.97593334
CASP4	0.96607684	1	-0.01321584	0.871781457	0.97593334
IL1RN	0.97593334	1	0.45616083	0.956178957	0.97593334
IL18	0.97593334	1	0.46255714	0.975933341	0.97593334
SIRT3	1	1	0.12306673	0.586578059	0.97593334
TMEM176B	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 ^a	p_value_log2	fdr_log2
<i>NLRP7</i>	0.11883877	0.87847857	-1.43340439	0.118838768	0.93807971
<i>IL18</i>	0.1981639	0.87847857	-0.41133656	0.237145531	0.93807971
<i>IL18R1</i>	0.27567576	0.87847857	-0.80848563	0.193730961	0.93807971
<i>PYCARD</i>	0.30505426	0.87847857	0.20522215	0.324660564	0.93807971
<i>TMEM176A</i>	0.44302914	0.87847857	-0.0569624	0.69003012	0.93807971
<i>AIM2</i>	0.49979366	0.87847857	-0.75123062	0.429215461	0.93807971
<i>NLRP12</i>	0.53313639	0.87847857	-0.11519728	0.533136387	0.93807971
<i>TMEM176B</i>	0.53995284	0.87847857	-0.01448501	0.756637021	0.93807971
<i>IL1RN</i>	0.53995284	0.87847857	2.1700564	0.388204956	0.93807971
<i>NLRP3</i>	0.60978261	0.87847857	-0.41559361	0.609782609	0.93807971
<i>NLRP6</i>	0.62191817	0.87847857	-0.37938013	0.621918166	0.93807971
<i>SIRT3</i>	0.66060345	0.87847857	0.09644427	0.60716929	0.93807971
<i>IL18RAP</i>	0.6777879	0.87847857	0.20423474	0.9658985	0.9658985
<i>IL1B</i>	0.68321676	0.87847857	2.29490109	0.68321676	0.93807971
<i>NLR4</i>	0.72110363	0.87847857	-0.02883275	0.826361869	0.93807971
<i>CASP1</i>	0.72110363	0.87847857	-0.17541481	0.89899306	0.93807971
<i>CASP4</i>	0.72110363	0.87847857	0.15641347	0.721103627	0.93807971
<i>IL1A</i>	0.7546836	0.87847857	2.81678569	0.7546836	0.93807971
<i>ABHD5</i>	0.75627594	0.87847857	0.07287696	0.756880106	0.93807971
<i>IL1R2</i>	0.7988051	0.87847857	0.84095489	0.798805099	0.93807971
<i>GSDMD</i>	0.83902191	0.87847857	-0.05960373	0.71436234	0.93807971
<i>IL1R1</i>	0.87847857	0.87847857	0.77439692	0.828883091	0.93807971
<i>IL1RAP</i>	0.87847857	0.87847857	0.17601368	0.878478572	0.93807971
<i>CASP5</i>	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 ^a	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=Log2(non responders/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
<i>IL18R1</i>	0,02143359	0,51440626	-0,4859683	0,021433594	0,51440626
<i>IL1RAP</i>	0,12932599	0,86453951	0,17706561	0,129325989	0,864539513
<i>NLRP12</i>	0,22875214	0,86453951	-0,066435	0,228752136	0,864539513
<i>NLRP7</i>	0,28588144	0,86453951	-0,2509041	0,285881445	0,864539513
<i>IL1R2</i>	0,30379486	0,86453951	0,16216661	0,303794861	0,864539513
<i>GSDMD</i>	0,30379486	0,86453951	0,00292277	0,303794861	0,864539513
<i>ABHD5</i>	0,36921692	0,86453951	0,21108858	0,369216919	0,864539513
<i>CASP4</i>	0,36921692	0,86453951	0,0423972	0,369216919	0,864539513
<i>NLRP3</i>	0,43614622	0,86453951	-0,1577218	0,43614622	0,864539513
<i>IL1RN</i>	0,44229889	0,86453951	0,32536957	0,442298889	0,864539513
<i>IL18RAP</i>	0,44229889	0,86453951	0,16380521	0,442298889	0,864539513
<i>SIRT3</i>	0,46035442	0,86453951	-0,0661062	0,460354416	0,864539513
<i>IL1B</i>	0,46829224	0,86453951	0,21193413	0,468292236	0,864539513
<i>IL18</i>	0,5508728	0,88139648	-0,0953584	0,550872803	0,881396484
<i>TMEM176A</i>	0,5508728	0,88139648	-0,422569	0,550872803	0,881396484
<i>IL1R1</i>	0,60945892	0,90792501	0,02509495	0,609458923	0,907925011
<i>NLRCA</i>	0,75676165	0,90792501	-0,0565318	0,756761647	0,907925011
<i>PYCARD</i>	0,76602936	0,90792501	-0,4921455	0,766029358	0,907925011
<i>TMEM176B</i>	0,79870605	0,90792501	-0,3214791	0,798706055	0,907925011
<i>CASP1</i>	0,79914976	0,90792501	0,03520439	0,799149764	0,907925011
<i>AIM2</i>	0,80196793	0,90792501	0,06147296	0,801967933	0,907925011
<i>NLRP6</i>	0,83226459	0,90792501	-0,080559	0,832264593	0,907925011
<i>IL1A</i>	0,88706869	0,9256369	-0,0472519	0,887068694	0,925636898
<i>CASP5</i>	1	1	-0,2518302	1	1

a: $fc=FC=\text{Log}_2(\text{on-treatment/pre-treatment})$

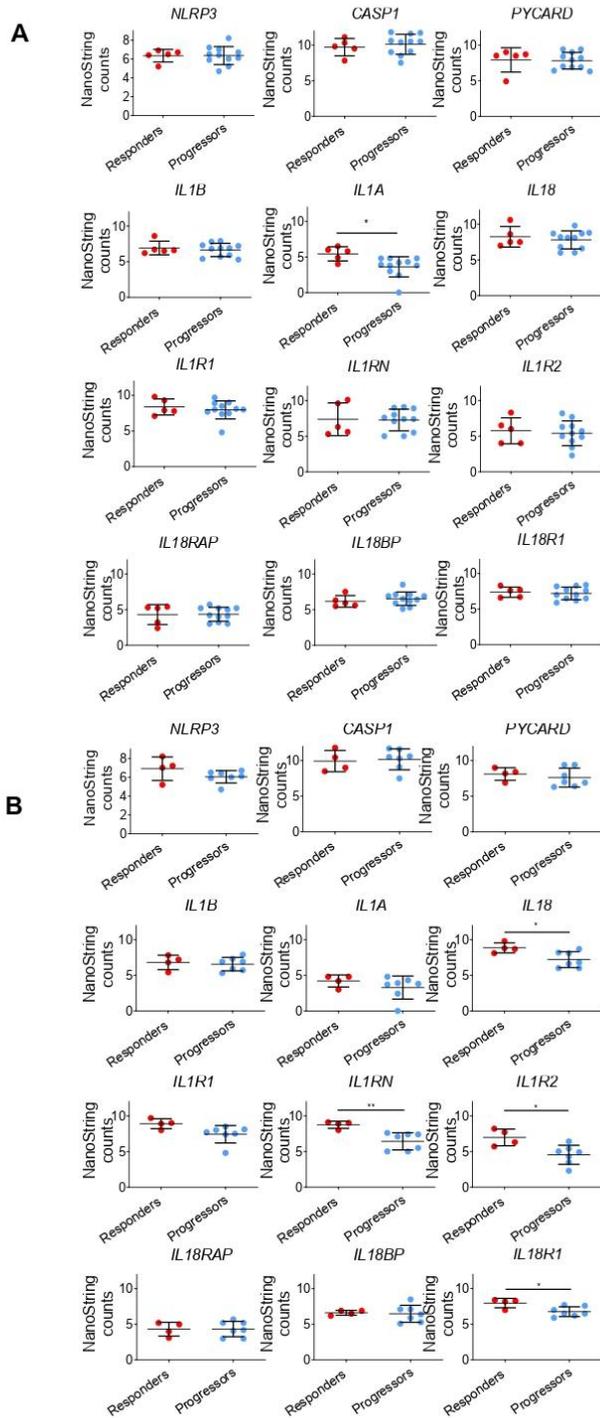


Figure S6. Related to Figure 5.

The log₂-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 ± SD are shown.

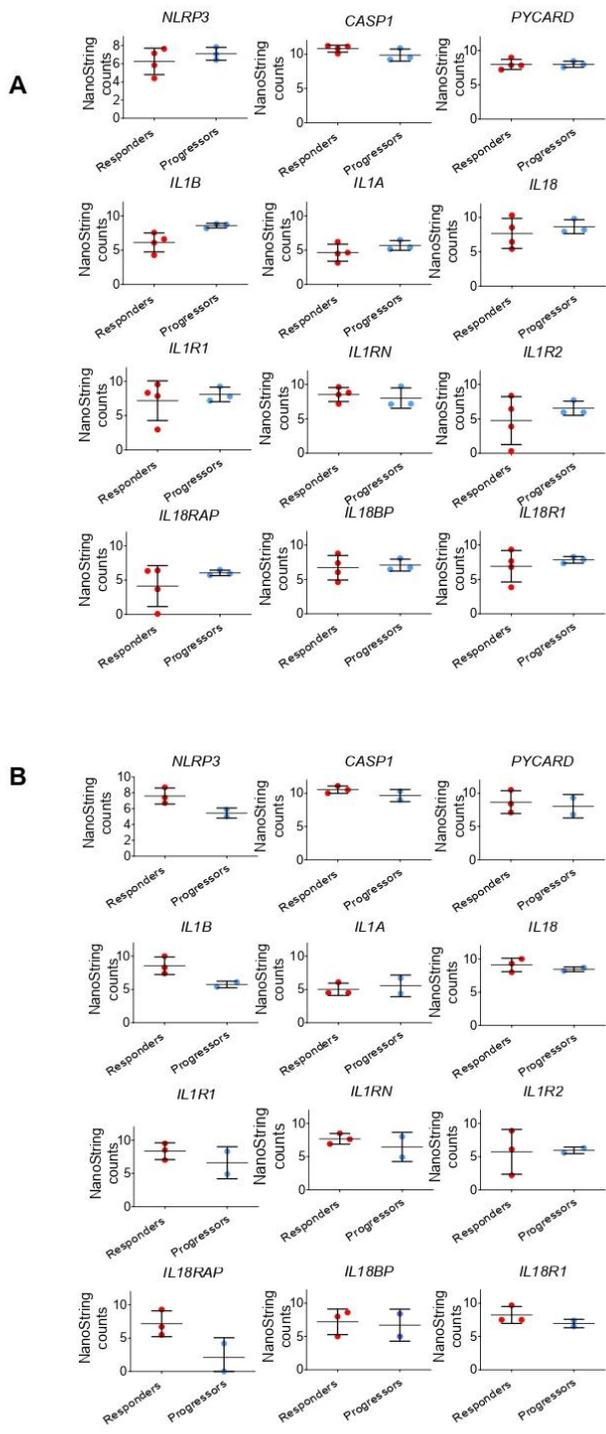


Figure S7. Related to Figure 5.

The log₂-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 \pm SD are shown.

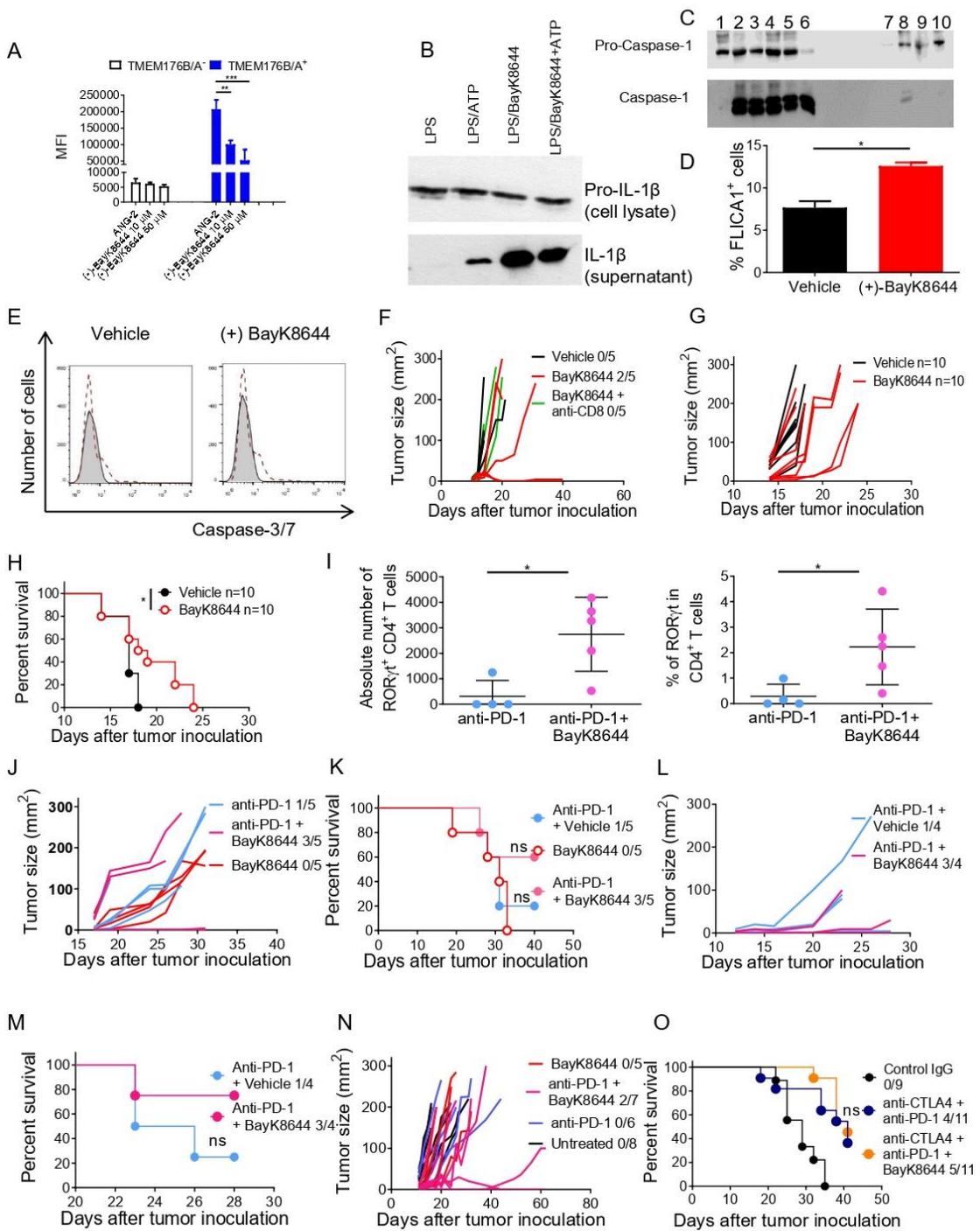


Figure S8. Related to Figure 6.

(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⁺-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⁺-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 β and IL-1 β expression. BMDCs were treated for 3 hr with 0.25 μ g/ml LPS. Cells were washed and then treated with 2 mM ATP, 2.5 μ M BayK8644 or both stimuli. Cell lysates and precipitated culture supernatants were electrophoresed, blotted and analyzed using an anti-IL-1 β 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⁺; 8: LPS/BayK8644 medium standard K⁺; 9: LPS/ATP medium high K⁺; 10: LPS/BayK medium high K⁺. One experiment representative of two is shown.

(D) Flow cytometry of active Caspase-1 in BMDCs treated with 5 μ 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 μ 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 1x10⁵ 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 β ⁺CD4⁺ROR γ t⁺ T cells within TDLN from tumor (EG7)-bearing mice treated with anti-PD-1 or anti-PD-1 + BayK8644. Anti-PD-1 antibody (250 μ 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 10⁵ LL/2 lung tumor cells. WT mice were injected with LL/2 cells and then treated with 250 μ 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 mm² 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 10⁶ MC38 colon cancer cells. WT mice were injected with MC38 cells and then treated with 250 μ 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 mm² 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 2.5×10^5 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-CTLA-4 + 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

Referencias Bibliográficas

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
2. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome-biological and translational implications. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(10):726-734. doi:10.1038/nrc3130
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9
4. Ehrlich P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneeskd*. 1909;5:273-290.
5. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*. 1970;13:1-27. doi:10.1159/000386035
6. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;3(11):991-998. doi:10.1038/ni1102-991
7. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(11):836-848. doi:10.1038/nri1961
8. OLD LJ, BOYSE EA. IMMUNOLOGY OF EXPERIMENTAL TUMORS. *Annu Rev Med*. 1964;15:167-186. doi:10.1146/annurev.me.15.020164.001123
9. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(8):557-569. doi:10.1038/nri3254
10. Clemente CG, Mihm MCJ, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*. 1996;77(7):1303-1310. doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19960401)77:7<1303::AID-CNCR12>3.0.CO;2-5
11. Rilke F, Colnaghi MI, Cascinelli N, et al. Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *Int J cancer*. 1991;49(1):44-49. doi:10.1002/ijc.2910490109
12. Lipponen PK, Eskelinen MJ, Jauhiainen K, Harju E, Terho R. Tumour infiltrating lymphocytes as an independent prognostic factor in transitional cell bladder cancer. *Eur J Cancer*. 1992;29A(1):69-75. doi:10.1016/0959-8049(93)90579-5
13. Nacopoulou L, Azaris P, Papacharalampous N, Davaris P. Prognostic significance of histologic host response in cancer of the large bowel. *Cancer*. 1981;47(5):930-936. doi:10.1002/1097-0142(19810301)47:5<930::aid-cncr2820470519>3.0.co;2-1
14. Epstein NA, Fatti LP. Prostatic carcinoma: some morphological features affecting prognosis. *Cancer*. 1976;37(5):2455-2465. doi:10.1002/1097-0142(197605)37:5<2455::aid-cncr2820370539>3.0.co;2-v
15. Deligdisch L, Jacobs AJ, Cohen CJ. Histologic correlates of virulence in ovarian adenocarcinoma. II. Morphologic correlates of host response. *Am J Obstet Gynecol*. 1982;144(8):885-889. doi:10.1016/0002-9378(82)90178-8
16. Jass JR. Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J Clin Pathol*. 1986;39(6):585-589. doi:10.1136/jcp.39.6.585
17. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J cancer*. 2010;127(4):759-767. doi:10.1002/ijc.25429

18. Facciabene A, Motz GT, Coukos G. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res.* 2012;72(9):2162-2171. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3687
19. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004;21(2):137-148. doi:10.1016/j.immuni.2004.07.017
20. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:235-271. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101324
21. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology.* 2007;121(1):1-14. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x
22. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:329-360. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803
23. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(10):715-727. doi:10.1038/nri1936
24. Myron Kauffman H, McBride MA, Cherikh WS, Spain PC, Marks WH, Roza AM. Transplant tumor registry: donor related malignancies. *Transplantation.* 2002;74(3):358-362. doi:10.1097/00007890-200208150-00011
25. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:267-296. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141609
26. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity.* 2013;39(1):1-10. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012
27. Drewes JL, Housseau F, Sears CL. Sporadic colorectal cancer: microbial contributors to disease prevention, development and therapy. *Br J Cancer.* 2016;115(3):273-280. doi:10.1038/bjc.2016.189
28. Irrazábal T, Belcheva A, Girardin SE, Martin A, Philpott DJ. The multifaceted role of the intestinal microbiota in colon cancer. *Mol Cell.* 2014;54(2):309-320. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.039
29. Ferguson TA, Choi J, Green DR. Armed response: how dying cells influence T-cell functions. *Immunol Rev.* 2011;241(1):77-88. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01006.x
30. Pio R, Ajona D, Ortiz-Espinosa S, Mantovani A, Lambris JD. Complementing the cancer-immunity cycle. *Front Immunol.* 2019;10(APR):1-12. doi:10.3389/fimmu.2019.00774
31. Hinshaw DC, Shevde LA. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res.* 2019;79(18):4557-4566. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-3962
32. Kim J, Bae JS. Tumor-associated macrophages and neutrophils in tumor microenvironment. *Mediators Inflamm.* 2016;2016. doi:10.1155/2016/6058147
33. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med.* 2018;24(5):541-550.

- doi:10.1038/s41591-018-0014-x
34. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 23):5591-5596. doi:10.1242/jcs.116392
 35. Mantovani A, Locati M. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(7):1478-1483. doi:10.1161/ATVBAHA.113.300168
 36. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004;25(12):677-686. doi:10.1016/j.it.2004.09.015
 37. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* 2018;233(9):6425-6440. doi:10.1002/jcp.26429
 38. Kuroda E, Ho V, Ruschmann J, et al. SHIP represses the generation of IL-3-induced M2 macrophages by inhibiting IL-4 production from basophils. *J Immunol.* 2009;183(6):3652-3660. doi:10.4049/jimmunol.0900864
 39. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(1):23-35. doi:10.1038/nri978
 40. Gabrilovich DI. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res.* 2017;5(1):3-8. doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0297
 41. Tartour E, Pere H, Maillere B, et al. Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2011;30(1):83-95. doi:10.1007/s10555-011-9281-4
 42. Cui TX, Kryczek I, Zhao L, et al. Myeloid-derived suppressor cells enhance stemness of cancer cells by inducing microRNA101 and suppressing the corepressor CtBP2. *Immunity.* 2013;39(3):611-621. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.025
 43. Deng J, Liu Y, Lee H, et al. S1PR1-STAT3 signaling is crucial for myeloid cell colonization at future metastatic sites. *Cancer Cell.* 2012;21(5):642-654. doi:10.1016/j.ccr.2012.03.039
 44. Raychaudhuri B, Rayman P, Huang P, et al. Myeloid derived suppressor cell infiltration of murine and human gliomas is associated with reduction of tumor infiltrating lymphocytes. *J Neurooncol.* 2015;122(2):293-301. doi:10.1007/s11060-015-1720-6
 45. Eruslanov E, Neuberger M, Daurkin I, et al. Circulating and tumor-infiltrating myeloid cell subsets in patients with bladder cancer. *Int J cancer.* 2012;130(5):1109-1119. doi:10.1002/ijc.26123
 46. Porembka MR, Mitchem JB, Belt BA, et al. Pancreatic adenocarcinoma induces bone marrow mobilization of myeloid-derived suppressor cells which promote primary tumor growth. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61(9):1373-1385. doi:10.1007/s00262-011-1178-0
 47. Yu J, Du W, Yan F, et al. Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *J Immunol.* 2013;190(7):3783-3797. doi:10.4049/jimmunol.1201449

48. Chistiakov DA, Sobenin IA, Orekhov AN, Bobryshev Y V. Myeloid dendritic cells: Development, functions, and role in atherosclerotic inflammation. *Immunobiology*. 2015;220(6):833-844. doi:10.1016/j.imbio.2014.12.010
49. Feng F, Zheng G, Wang Q, et al. Low lymphocyte count and high monocyte count predicts poor prognosis of gastric cancer. *BMC Gastroenterol*. 2018;18(1):148. doi:10.1186/s12876-018-0877-9
50. Miksch RC, Schoenberg MB, Weniger M, et al. Prognostic Impact of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Neutrophils on Survival of Patients with Upfront Resection of Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11(1). doi:10.3390/cancers11010039
51. Fu Q, Chen N, Ge C, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology*. 2019;8(7):1593806. doi:10.1080/2162402X.2019.1593806
52. Blank CU, Haining WN, Held W, et al. Defining "T cell exhaustion". *Nat Rev Immunol*. 2019;19(11):665-674. doi:10.1038/s41577-019-0221-9
53. Siddiqui I, Schaeuble K, Chennupati V, et al. Intratumoral Tcf1 + PD-1 + CD8 + T Cells with Stem-like Properties Promote Tumor Control in Response to Vaccination and Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Immunity*. 2019;50(1):195-211.e10. doi:10.1016/j.immuni.2018.12.021
54. Lu Y, Wang Q, Xue G, et al. Th9 Cells Represent a Unique Subset of CD4(+) T Cells Endowed with the Ability to Eradicate Advanced Tumors. *Cancer Cell*. 2018;33(6):1048-1060.e7. doi:10.1016/j.ccell.2018.05.004
55. Bhome R, Bullock MD, Al Saihati HA, et al. A top-down view of the tumor microenvironment: structure, cells and signaling. *Front cell Dev Biol*. 2015;3:33. doi:10.3389/fcell.2015.00033
56. Chraa D, Naim A, Olive D, Badou A. T lymphocyte subsets in cancer immunity: Friends or foes. *J Leukoc Biol*. 2019;105(2):243-255. doi:10.1002/JLB.MR0318-097R
57. Abbas_inmunologia_6a.pdf.
58. Gardner A, de Mingo Pulido Á, Ruffell B. Dendritic Cells and Their Role in Immunotherapy. *Front Immunol*. 2020;11(May):1-14. doi:10.3389/fimmu.2020.00924
59. Cabeza-Cabrerizo M, van Blijswijk J, Wienert S, et al. Tissue clonality of dendritic cell subsets and emergency DCpoiesis revealed by multicolor fate mapping of DC progenitors. *Sci Immunol*. 2019;4(33). doi:10.1126/sciimmunol.aaw1941
60. Worbs T, Hammerschmidt SI, Förster R. Dendritic cell migration in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(1):30-48. doi:10.1038/nri.2016.116
61. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.767
62. Orabona C, Grohmann U, Belladonna ML, et al. CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86. *Nat Immunol*. 2004;5(11):1134-1142. doi:10.1038/ni1124
63. Balan S, Saxena M, Bhardwaj N. *Dendritic Cell Subsets and Locations*. Vol 348. 1st ed. Elsevier Inc.; 2019. doi:10.1016/bs.ircmb.2019.07.004
64. Wculek SK, Cueto FJ, Mujal AM, Melero I, Krummel MF, Sancho D. Dendritic

- cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(1):7-24. doi:10.1038/s41577-019-0210-z
65. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:563-604. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074950
 66. Segura E, Amigorena S. *Cross-Presentation in Mouse and Human Dendritic Cells*. Vol 127. 1st ed. Elsevier Inc.; 2015. doi:10.1016/bs.ai.2015.03.002
 67. Bosteels C, Neyt K, Vanheerswynghels M, et al. Inflammatory Type 2 cDCs Acquire Features of cDC1s and Macrophages to Orchestrate Immunity to Respiratory Virus Infection. *Immunity*. 2020;52(6):1039-1056.e9. doi:10.1016/j.immuni.2020.04.005
 68. Dress RJ, Wong AY, Ginhoux F. Homeostatic control of dendritic cell numbers and differentiation. *Immunol Cell Biol*. 2018;96(5):463-476. doi:10.1111/imcb.12028
 69. Gros M, Amigorena S. Regulation of Antigen Export to the Cytosol During Cross-Presentation. *Front Immunol*. 2019;10:41. doi:10.3389/fimmu.2019.00041
 70. Crozat K, Tamoutounour S, Vu Manh T-P, et al. Cutting edge: expression of XCR1 defines mouse lymphoid-tissue resident and migratory dendritic cells of the CD8 α + type. *J Immunol*. 2011;187(9):4411-4415. doi:10.4049/jimmunol.1101717
 71. Langlet C, Tamoutounour S, Henri S, et al. CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. *J Immunol*. 2012;188(4):1751-1760. doi:10.4049/jimmunol.1102744
 72. Tailor P, Tamura T, Morse HC 3rd, Ozato K. The BXH2 mutation in IRF8 differentially impairs dendritic cell subset development in the mouse. *Blood*. 2008;111(4):1942-1945. doi:10.1182/blood-2007-07-100750
 73. Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, et al. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8 α + dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science*. 2008;322(5904):1097-1100. doi:10.1126/science.1164206
 74. Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science*. 2007;315(5808):107-111. doi:10.1126/science.1136080
 75. Yamazaki C, Sugiyama M, Ohta T, et al. Critical roles of a dendritic cell subset expressing a chemokine receptor, XCR1. *J Immunol*. 2013;190(12):6071-6082. doi:10.4049/jimmunol.1202798
 76. Ferris ST, Durai V, Wu R, et al. cDC1 prime and are licensed by CD4(+) T cells to induce anti-tumour immunity. *Nature*. 2020;584(7822):624-629. doi:10.1038/s41586-020-2611-3
 77. Binnewies M, Mujal AM, Pollack JL, et al. Unleashing Type-2 Dendritic Cells to Drive Protective Antitumor CD4 + T Cell Immunity. *Cell*. 2019;177(3):556-571.e16. doi:10.1016/j.cell.2019.02.005
 78. Durai V, Murphy KM. Functions of Murine Dendritic Cells. *Immunity*. Published online 2016. doi:10.1016/j.immuni.2016.10.010

79. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*. 2018;154(1):3-20. doi:10.1111/imm.12888
80. Villani A-C, Satija R, Reynolds G, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science*. 2017;356(6335). doi:10.1126/science.aah4573
81. Brown CC, Gudjonson H, Pritykin Y, et al. Transcriptional Basis of Mouse and Human Dendritic Cell Heterogeneity. *Cell*. 2019;179(4):846-863.e24. doi:10.1016/j.cell.2019.09.035
82. Bourdely P, Anselmi G, Vaivode K, et al. Transcriptional and Functional Analysis of CD1c+ Human Dendritic Cells Identifies a CD163+ Subset Priming CD8+CD103+ T Cells. *Immunity*. 2020;53(2):335-352.e8. doi:10.1016/j.immuni.2020.06.002
83. Sittig SP, Bakdash G, Weiden J, et al. A Comparative Study of the T Cell Stimulatory and Polarizing Capacity of Human Primary Blood Dendritic Cell Subsets. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:3605643. doi:10.1155/2016/3605643
84. Segura E, Durand M, Amigorena S. Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells. *J Exp Med*. 2013;210(5):1035-1047. doi:10.1084/jem.20121103
85. Yin X, Yu H, Jin X, et al. Human Blood CD1c+ Dendritic Cells Encompass CD5high and CD5low Subsets That Differ Significantly in Phenotype, Gene Expression, and Functions. *J Immunol*. 2017;198(4):1553-1564. doi:10.4049/jimmunol.1600193
86. Gallo PM, Gallucci S. The dendritic cell response to classic, emerging, and homeostatic danger signals. Implications for autoimmunity. *Front Immunol*. 2013;4:138. doi:10.3389/fimmu.2013.00138
87. Savina A, Amigorena S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev*. 2007;219:143-156. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00552.x
88. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:443-473. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095910
89. Aguilera R, Saffie C, Tittarelli A, et al. Heat-shock induction of tumor-derived danger signals mediates rapid monocyte differentiation into clinically effective dendritic cells. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2011;17(8):2474-2483. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2384
90. Kotsias F, Cebrian I, Alloatti A. Antigen processing and presentation. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2019;348:69-121. doi:10.1016/bs.ircmb.2019.07.005
91. Cebrian I, Visentin G, Blanchard N, et al. Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells. *Cell*. 2011;147(6):1355-1368. doi:10.1016/j.cell.2011.11.021
92. Savina A, Peres A, Cebrian I, et al. The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalinization and antigen crosspresentation selectively in CD8(+) dendritic cells. *Immunity*. 2009;30(4):544-555. doi:10.1016/j.immuni.2009.01.013
93. Claus V, Jahraus A, Tjelle T, et al. Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes. *J Biol Chem*. 1998;273(16):9842-9851. doi:10.1074/jbc.273.16.9842

94. Trombetta ES, Ebersold M, Garrett W, Pypaert M, Mellman I. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science*. 2003;299(5611):1400-1403. doi:10.1126/science.1080106
95. Jancic C, Savina A, Wasmeier C, et al. Rab27a regulates phagosomal pH and NADPH oxidase recruitment to dendritic cell phagosomes. *Nat Cell Biol*. 2007;9(4):367-378. doi:10.1038/ncb1552
96. Paardekooper LM, Dingjan I, Linders PTA, et al. Human Monocyte-Derived Dendritic Cells Produce Millimolar Concentrations of ROS in Phagosomes Per Second. *Front Immunol*. 2019;10:1216. doi:10.3389/fimmu.2019.01216
97. Segovia M, Louvet C, Charnet P, Savina A, Tilly G, Gautreau L. Europe PMC Funders Group Autologous Dendritic Cells Prolong Allograft Survival Through Tmem176b -Dependent Antigen Cross-Presentation. 2015;14(5):1021-1031. doi:10.1111/ajt.12708.Autologous
98. Howland SW, Wittrup KD. Antigen Release Kinetics in the Phagosome Are Critical to Cross-Presentation Efficiency. *J Immunol*. 2008;180(3):1576-1583. doi:10.4049/jimmunol.180.3.1576
99. Amigorena S, Savina A. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(1):109-117. doi:10.1016/j.coi.2010.01.022
100. Sánchez-Paulete AR, Cueto FJ, Martínez-López M, et al. Cancer Immunotherapy with Immunomodulatory Anti-CD137 and Anti-PD-1 Monoclonal Antibodies Requires BATF3-Dependent Dendritic Cells. *Cancer Discov*. 2016;6(1):71-79. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0510
101. Wculek SK, Amores-Iniesta J, Conde-Garrosa R, Khouili SC, Melero I, Sancho D. Effective cancer immunotherapy by natural mouse conventional type-1 dendritic cells bearing dead tumor antigen. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):1-16. doi:10.1186/s40425-019-0565-5
102. Wculek SK, Amores-Iniesta J, Conde-Garrosa R, Khouili SC, Melero I, Sancho D. Effective cancer immunotherapy by natural mouse conventional type-1 dendritic cells bearing dead tumor antigen. *J Immunother cancer*. 2019;7(1):100. doi:10.1186/s40425-019-0565-5
103. Roberts EW, Broz ML, Binnewies M, et al. Critical Role for CD103(+)/CD141(+) Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and Priming of T Cell Immunity in Melanoma. *Cancer Cell*. 2016;30(2):324-336. doi:10.1016/j.ccell.2016.06.003
104. Salmon H, Idoyaga J, Rahman A, et al. Expansion and Activation of CD103(+) Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity*. 2016;44(4):924-938. doi:10.1016/j.immuni.2016.03.012
105. Zilionis R, Engblom C, Pfirschke C, et al. Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species. *Immunity*. 2019;50(5):1317-1334.e10. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.009
106. Ishizuka JJ, Manguso RT, Cheruiyot CK, et al. Loss of ADAR1 in tumours overcomes resistance to immune checkpoint blockade. *Nature*. 2019;565(7737):43-48. doi:10.1038/s41586-018-0768-9

107. Kammertoens T, Friese C, Arina A, et al. Tumour ischaemia by interferon- γ resembles physiological blood vessel regression. *Nature*. 2017;545(7652):98-102. doi:10.1038/nature22311
108. Tussiwand R, Everts B, Grajales-Reyes GE, et al. Klf4 expression in conventional dendritic cells is required for T helper 2 cell responses. *Immunity*. 2015;42(5):916-928. doi:10.1016/j.immuni.2015.04.017
109. Ghoreschi K, Laurence A, Yang X-P, et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature*. 2010;467(7318):967-971. doi:10.1038/nature09447
110. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 2006;441(7090):231-234. doi:10.1038/nature04754
111. Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, et al. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*. 2009;30(4):576-587. doi:10.1016/j.immuni.2009.02.007
112. McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol*. 2009;10(3):314-324. doi:10.1038/ni.1698
113. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006;126(6):1121-1133. doi:10.1016/j.cell.2006.07.035
114. Asadzadeh Z, Mohammadi H, Safarzadeh E, et al. The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. *Cell Immunol*. 2017;322(October):15-25. doi:10.1016/j.cellimm.2017.10.015
115. Martin F, Apetoh L, Ghiringhelli F. Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF- β -dependent immunosuppressive activity? *Trends Mol Med*. 2012;18(12):742-749. doi:10.1016/j.molmed.2012.09.007
116. Acosta-Rodriguez E V, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*. 2007;8(9):942-949. doi:10.1038/ni1496
117. Lakshmi Narendra B, Eshvendar Reddy K, Shantikumar S, Ramakrishna S. Immune system: a double-edged sword in cancer. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc*. [et al]. 2013;62(9):823-834. doi:10.1007/s00011-013-0645-9
118. K llgaard T, Ugurel-Becker S, Idorn M, Andersen MH, Becker JC, Straten PT. Pre-Vaccination Frequencies of Th17 Cells Correlate with Vaccine-Induced T-Cell Responses to Survivin-Derived Peptide Epitopes. *PLoS One*. 2015;10(7):e0131934. doi:10.1371/journal.pone.0131934
119. Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, et al. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity*. 2009;31(5):787-798. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.014
120. Segovia M, Russo S, Jeldres M, et al. Targeting TMEM176B Enhances Antitumor Immunity and Augments the Efficacy of Immune Checkpoint Blockers by Unleashing Inflammasome Activation. *Cancer Cell*. 2019;35(5):767-781.e6. doi:10.1016/j.ccell.2019.04.003

121. Condamine T, Le Texier L, Howie D, et al. Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2010;88(3):507-515. doi:10.1189/jlb.1109738
122. Louvet C, Chiffolleau E, Heslan M, et al. Identification of a new member of the CD20/FcεRIβ family overexpressed in tolerated allografts. *Am J Transplant.* 2005;5(9):2143-2153. doi:10.1111/j.1600-6143.2005.01007.x
123. Eon Kuek L, Leffler M, Mackay GA, Hulett MD. The MS4A family: counting past 1, 2 and 3. *Immunol Cell Biol.* 2016;94(1):11-23. doi:10.1038/icb.2015.48
124. Drujont L, Lemoine A, Moreau A, et al. RORγt + cells selectively express redundant cation channels linked to the Golgi apparatus. *Sci Rep.* 2016;6:1-13. doi:10.1038/srep23682
125. Anandasabapathy N, Feder R, Mollah S, et al. Classical Flt3L-dependent dendritic cells control immunity to protein vaccine. *J Exp Med.* 2014;211(9):1875-1891. doi:10.1084/jem.20131397
126. Gao Y, Nish SA, Jiang R, et al. Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells. *Immunity.* 2013;39(4):722-732. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.028
127. Dhodapkar M V, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med.* 2001;193(2):233-238. doi:10.1084/jem.193.2.233
128. Dhodapkar M V, Steinman RM. Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans. *Blood.* 2002;100(1):174-177. doi:10.1182/blood.v100.1.174
129. Segura E, Touzot M, Bohineust A, et al. Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation. *Immunity.* 2013;38(2):336-348. doi:10.1016/j.immuni.2012.10.018
130. Sun L, Zhang Y, Zhang C. Distinct Expression and Prognostic Value of MS4A in Gastric Cancer. *Open Med (Warsaw, Poland).* 2018;13:178-188. doi:10.1515/med-2018-0028
131. Cuajungco MP, Podevin W, Valluri VK, Bui Q, Nguyen VH, Taylor K. Abnormal accumulation of human transmembrane (TMEM)-176A and 176B proteins is associated with cancer pathology. *Acta Histochem.* 2012;114(7):705-712. doi:10.1016/j.acthis.2011.12.006
132. Otsubo T, Hida Y, Ohga N, et al. Identification of novel targets for antiangiogenic therapy by comparing the gene expressions of tumor and normal endothelial cells. *Cancer Sci.* 2014;105(5):560-567. doi:10.1111/cas.12394
133. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. *Cell.* 2010;140(6):821-832. doi:10.1016/j.cell.2010.01.040
134. Vanaja SK, Rathinam VAK, Fitzgerald KA. Mechanisms of inflammasome activation: Recent advances and novel insights. *Trends Cell Biol.* 2015;25(5):308-315. doi:10.1016/j.tcb.2014.12.009
135. Platnich JM, Muruve DA. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. *Arch Biochem Biophys.* 2019;670(December 2018):4-14. doi:10.1016/j.abb.2019.02.008

136. Eren E, Özören N. The NLRP3 inflammasome: A new player in neurological diseases. *Turkish J Biol.* 2019;43(6):349-359. doi:10.3906/biy-1909-31
137. Broderick L, De Nardo D, Franklin BS, Hoffman HM, Latz E. The inflammasomes and autoinflammatory syndromes. *Annu Rev Pathol.* 2015;10:395-424. doi:10.1146/annurev-pathol-012414-040431
138. Liu D, Zeng X, Li X, et al. Advances in the molecular mechanisms of NLRP3 inflammasome activators and inactivators. *Biochem Pharmacol.* 2020;175:113863. doi:10.1016/j.bcp.2020.113863
139. Tang T, Lang X, Xu C, et al. CLICs-dependent chloride efflux is an essential and proximal upstream event for NLRP3 inflammasome activation. *Nat Commun.* 2017;8(1):202. doi:10.1038/s41467-017-00227-x
140. Raval RR, Sharabi AB, Walker AJ, Drake CG, Sharma P. Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 SITC primer. *J Immunother cancer.* 2014;2:14. doi:10.1186/2051-1426-2-14
141. Galluzzi L, Vacchelli E, Bravo-San Pedro J-M, et al. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget.* 2014;5(24):12472-12508. doi:10.18632/oncotarget.2998
142. Kimiz-Gebologlu I, Gulce-Iz S, Biray-Avci C. Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. *Mol Biol Rep.* 2018;45(6):2935-2940. doi:10.1007/s11033-018-4427-x
143. Humblet Y. Cetuximab: an IgG(1) monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours. *Expert Opin Pharmacother.* 2004;5(7):1621-1633. doi:10.1517/14656566.5.7.1621
144. Scott SD. Rituximab: a new therapeutic monoclonal antibody for non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Pract.* 1998;6(3):195-197. doi:10.1046/j.1523-5394.1998.006003195.x
145. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber H-P, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(5):391-400. doi:10.1038/nrd1381
146. Naran K, Nundalall T, Chetty S, Barth S. Principles of Immunotherapy: Implications for Treatment Strategies in Cancer and Infectious Diseases. *Front Microbiol.* 2018;9(December):1-23. doi:10.3389/fmicb.2018.03158
147. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov.* 2018;8(9):1069-1086. doi:10.1158/2159-8290.CD-18-0367
148. Ott PA, Hodi FS, Robert C. CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* 2013;19(19):5300-5309. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0143
149. Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annu Rev Immunol.* 2016;34:539-573. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112049
150. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:515-548. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115611
151. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science.*

- 2011;332(6029):600-603. doi:10.1126/science.1202947
152. Schildberg FA, Klein SR, Freeman GJ, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity*. 2016;44(5):955-972. doi:10.1016/j.immuni.2016.05.002
 153. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(8):711-723. doi:10.1056/NEJMoa1003466
 154. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2517-2526. doi:10.1056/NEJMoa1104621
 155. Peggs KS, Quezada SA, Chambers CA, Korman AJ, Allison JP. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J Exp Med*. 2009;206(8):1717-1725. doi:10.1084/jem.20082492
 156. Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T. A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat Immunol*. 2013;14(12):1212-1218. doi:10.1038/ni.2762
 157. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000;192(7):1027-1034. doi:10.1084/jem.192.7.1027
 158. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2001;2(3):261-268. doi:10.1038/85330
 159. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331
 160. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2010;236:219-242. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x
 161. Sheppard K-A, Fitz LJ, Lee JM, et al. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett*. 2004;574(1-3):37-41. doi:10.1016/j.febslet.2004.07.083
 162. Patsoukis N, Brown J, Petkova V, Liu F, Li L, Boussiotis VA. Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation. *Sci Signal*. 2012;5(230):ra46. doi:10.1126/scisignal.2002796
 163. Chemnitz JM, Parry R V, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol*. 2004;173(2):945-954. doi:10.4049/jimmunol.173.2.945
 164. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med*. 2009;206(13):3015-3029. doi:10.1084/jem.20090847
 165. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011;12(6):492-499.

- doi:10.1038/ni.2035
166. Hill M, Segovia M, Russo S, Girotti MR, Rabinovich GA. The Paradoxical Roles of Inflammation during PD-1 Blockade in Cancer. *Trends Immunol.* 2020;41(11):982-993. doi:10.1016/j.it.2020.09.003
 167. Kamphorst AO, Wieland A, Nasti T, et al. Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. *Science.* 2017;355(6332):1423-1427. doi:10.1126/science.aaf0683
 168. Ali A, Ahmed S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *Int J Biol Macromol.* 2018;109:273-286. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078
 169. Hoshyar N, Gray S, Han H, Bao G. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine (Lond).* 2016;11(6):673-692. doi:10.2217/nnm.16.5
 170. Murphy CJ, Sau TK, Gole AM, et al. Anisotropic metal nanoparticles: Synthesis, assembly, and optical applications. *J Phys Chem B.* 2005;109(29):13857-13870. doi:10.1021/jp0516846
 171. Wu K, Su D, Liu J, Saha R, Wang J-P. Magnetic nanoparticles in nanomedicine: a review of recent advances. *Nanotechnology.* 2019;30(50):502003. doi:10.1088/1361-6528/ab4241
 172. Sperling RA, Parak WJ. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philos Trans Ser A, Math Phys Eng Sci.* 2010;368(1915):1333-1383. doi:10.1098/rsta.2009.0273
 173. Langille MR, Personick ML, Zhang J, Mirkin CA. Defining rules for the shape evolution of gold nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2012;134(35):14542-14554. doi:10.1021/ja305245g
 174. Sapsford KE, Algar WR, Berti L, et al. Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chem Rev.* 2013;113(3):1904-2074. doi:10.1021/cr300143v
 175. Kobayashi T. Cancer hyperthermia using magnetic nanoparticles. Published online 2011:1342-1347. doi:10.1002/biot.201100045
 176. Aljabali AAA, Shukla S, Lomonosoff GP, Steinmetz NF, Evans DJ. CPMV-DOX delivers. *Mol Pharm.* 2013;10(1):3-10. doi:10.1021/mp3002057
 177. Zhang X-F, Liu Z-G, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9). doi:10.3390/ijms17091534
 178. Chen ZG. Small-molecule delivery by nanoparticles for anticancer therapy. *Trends Mol Med.* 2010;16(12):594-602. doi:10.1016/j.molmed.2010.08.001
 179. Li S-Y, Liu Y, Xu C-F, et al. Restoring anti-tumor functions of T cells via nanoparticle-mediated immune checkpoint modulation. *J Control Release.* 2016;231:17-28. doi:10.1016/j.jconrel.2016.01.044
 180. Ashley CE, Carnes EC, Phillips GK, et al. The targeted delivery of multicomponent cargos to cancer cells by nanoporous particle-supported lipid bilayers. *Nat Mater.* 2011;10(5):389-397. doi:10.1038/nmat2992
 181. Greish K. Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting. *Methods Mol Biol.* 2010;624:25-37. doi:10.1007/978-1-60761-609-2_3
 182. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: the

- impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;66:2-25. doi:10.1016/j.addr.2013.11.009
183. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol.* 2007;2(12):751-760. doi:10.1038/nnano.2007.387
 184. Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* Published online 2020. doi:10.1038/s41573-020-0090-8
 185. Zhao L, Seth A, Wibowo N, et al. Nanoparticle vaccines. *Vaccine.* 2014;32(3):327-337. doi:10.1016/j.vaccine.2013.11.069
 186. Torrecilla D, Lozano M V., Lallana E, et al. Anti-tumor efficacy of chitosan-g-poly(ethylene glycol) nanocapsules containing docetaxel: Anti-TMEFF-2 functionalized nanocapsules vs. non-functionalized nanocapsules. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;83(3):330-337. doi:10.1016/j.ejpb.2012.10.017
 187. Jain A, Thakur K, Kush P, Jain UK. Docetaxel loaded chitosan nanoparticles: formulation, characterization and cytotoxicity studies. *Int J Biol Macromol.* 2014;69:546-553. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.06.029
 188. Shi G-N, Zhang C-N, Xu R, et al. Enhanced antitumor immunity by targeting dendritic cells with tumor cell lysate-loaded chitosan nanoparticles vaccine. *Biomaterials.* 2017;113:191-202. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.10.047
 189. Yang R, Xu J, Xu L, et al. Cancer Cell Membrane-Coated Adjuvant Nanoparticles with Mannose Modification for Effective Anticancer Vaccination. *ACS Nano.* 2018;12(6):5121-5129. doi:10.1021/acsnano.7b09041
 190. Chen PG, Huang ZH, Sun ZY, et al. Chitosan nanoparticles based nanovaccines for cancer immunotherapy. *Pure Appl Chem.* 2017;89(7):931-939. doi:10.1515/pac-2016-0913
 191. Kim H, Niu L, Larson P, et al. Polymeric nanoparticles encapsulating novel TLR7/8 agonists as immunostimulatory adjuvants for enhanced cancer immunotherapy. *Biomaterials.* 2018;164:38-53. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.02.034
 192. Da Silva CG, Camps MGM, Li TMWY, Chan AB, Ossendorp F, Cruz LJ. Co-delivery of immunomodulators in biodegradable nanoparticles improves therapeutic efficacy of cancer vaccines. *Biomaterials.* 2019;220:119417. doi:10.1016/j.biomaterials.2019.119417
 193. Foged C, Brodin B, Frokjaer S, Sundblad A. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *Int J Pharm.* 2005;298(2):315-322. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.03.035
 194. Hirai T, Yoshioka Y, Takahashi H, et al. Amorphous silica nanoparticles enhance cross-presentation in murine dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;427(3):553-556. doi:10.1016/j.bbrc.2012.09.095
 195. Tang et al. 2005. 基因的改变 NIH Public Access. *Bone.* 2008;23(1):1-7.
 196. Belizaire R, Unanue ER. Targeting proteins to distinct subcellular compartments reveals unique requirements for MHC class I and II presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(41):17463-17468. doi:10.1073/pnas.0908583106
 197. Harding C V, Collins DS, Slot JW, Geuze HJ, Unanue ER. Liposome-encapsulated antigens are processed in lysosomes, recycled, and presented to T cells. *Cell.*

- 1991;64(2):393-401. doi:10.1016/0092-8674(91)90647-h
198. Gong N, Zhang Y, Teng X, et al. Proton-driven transformable nanovaccine for cancer immunotherapy. *Nat Nanotechnol.* 2020;15(12):1053-1064. doi:10.1038/s41565-020-00782-3
 199. Pfirschke C, Engblom C, Rickelt S, et al. Immunogenic Chemotherapy Sensitizes Tumors to Checkpoint Blockade Therapy. *Immunity.* 2016;44(2):343-354. doi:10.1016/j.immuni.2015.11.024
 200. Varga J, Greten FR. Cell plasticity in epithelial homeostasis and tumorigenesis. *Nat Cell Biol.* 2017;19(10):1133-1141. doi:10.1038/ncb3611
 201. Harding SM, Benci JL, Irianto J, Discher DE, Minn AJ, Greenberg RA. Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. *Nature.* 2017;548(7668):466-470. doi:10.1038/nature23470
 202. Wang H, Hu S, Chen X, et al. cGAS is essential for the antitumor effect of immune checkpoint blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(7):1637-1642. doi:10.1073/pnas.1621363114
 203. Takeda Y, Kataoka K, Yamagishi J, Ogawa S, Seya T, Matsumoto M. A TLR3-Specific Adjuvant Relieves Innate Resistance to PD-L1 Blockade without Cytokine Toxicity in Tumor Vaccine Immunotherapy. *Cell Rep.* 2017;19(9):1874-1887. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.015
 204. Karki R, Kanneganti T-D. Diverging inflammasome signals in tumorigenesis and potential targeting. *Nat Rev Cancer.* 2019;19(4):197-214. doi:10.1038/s41568-019-0123-y
 205. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med.* 2007;13(1):54-61. doi:10.1038/nm1523
 206. Gebremeskel S, Johnston B. Concepts and mechanisms underlying chemotherapy induced immunogenic cell death: Impact on clinical studies and considerations for combined therapies. *Oncotarget.* 2015;6(39):41600-41619. doi:10.18632/oncotarget.6113
 207. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med.* 2009;15(10):1170-1178. doi:10.1038/nm.2028
 208. Hafner-Bratkovič I, Pelegrín P. Ion homeostasis and ion channels in NLRP3 inflammasome activation and regulation. *Curr Opin Immunol.* 2018;52:8-17. doi:10.1016/j.coi.2018.03.010
 209. Li X-Y, Moesta AK, Xiao C, et al. Targeting CD39 in Cancer Reveals an Extracellular ATP- and Inflammasome-Driven Tumor Immunity. *Cancer Discov.* 2019;9(12):1754-1773. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-0541
 210. Perregaux DG, McNiff P, Laliberte R, Conklyn M, Gabel CA. ATP acts as an agonist to promote stimulus-induced secretion of IL-1 β and IL-18 in human blood. *J Immunol.* 2000;165(8):4615-4623. doi:10.4049/jimmunol.165.8.4615
 211. Douguet L, Janho Dit Hreich S, Benzaquen J, et al. A small-molecule P2RX7 activator promotes anti-tumor immune responses and sensitizes lung tumor to immunotherapy. *Nat Commun.* 2021;12(1):653. doi:10.1038/s41467-021-20912-2
 212. Kaplanov I, Carmi Y, Kornetsky R, et al. Blocking IL-1 β reverses the

- immunosuppression in mouse breast cancer and synergizes with anti-PD-1 for tumor abrogation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(4):1361-1369. doi:10.1073/pnas.1812266115
213. Ridker PM, MacFadyen JG, Thuren T, Everett BM, Libby P, Glynn RJ. Effect of interleukin-1 β inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2017;390(10105):1833-1842. doi:10.1016/S0140-6736(17)32247-X
 214. Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nat Immunol*. 2012;13(4):343-351. doi:10.1038/ni.2224
 215. Segovia M, Cuturi MC, Hill M. Preparation of mouse bone marrow-derived dendritic cells with immunoregulatory properties. *Methods Mol Biol*. 2011;677:161-168. doi:10.1007/978-1-60761-869-0_11
 216. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
 217. Cafri G, Sharbi-Yunger A, Tzehoval E, Eisenbach L. Production of LacZ inducible T cell hybridoma specific for human and mouse gp100₂₅₋₃₃ peptides. *PLoS One*. 2013;8(2):e55583. doi:10.1371/journal.pone.0055583
 218. Ostroumov D, Fekete-Drimusz N, Saborowski M, Kühnel F, Woller N. CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(4):689-713. doi:10.1007/s00018-017-2686-7
 219. Han H. Nnm-11-673.Pdf. 2016;11:673-692.
 220. Fan W, Yan W, Xu Z, Ni H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2012;90:21-27. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.09.042
 221. Zajac A, Hanuza J, Wandas M, Dymińska L. Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2015;134:114-120. doi:10.1016/j.saa.2014.06.071
 222. Mushayakarara E, Albon N, Levin IW. Effect of water on the molecular structure of a phosphatidylcholine hydrate. Raman spectroscopic analysis of the phosphate, carbonyl and carbon-hydrogen stretching mode regions of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine dihydrate. *Biochim Biophys Acta*. 1982;686(2):153-159. doi:10.1016/0005-2736(82)90107-9
 223. De Gussem K, Vandenabeele P, Verbeken A, Moens L. Raman spectroscopic study of Lactarius spores (Russulales, Fungi). *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2005;61(13-14):2896-2908. doi:10.1016/j.saa.2004.10.038
 224. Savina A, Jancic C, Hugues S, et al. NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell*. 2006;126(1):205-218. doi:10.1016/j.cell.2006.05.035
 225. Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release*. 2008;125(3):193-209. doi:10.1016/j.jconrel.2007.09.013
 226. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific

- nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev.* 2001;53(2):283-318.
227. Vasir JK, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(8):718-728. doi:10.1016/j.addr.2007.06.003
 228. Petros RA, DeSimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(8):615-627. doi:10.1038/nrd2591
 229. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release.* 2016;235:337-351. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017
 230. Pei M, Xu R, Zhang C, Wang X, Li C, Hu Y. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Mannose-functionalized antigen nanoparticles for targeted dendritic cells , accelerated endosomal escape and enhanced MHC-I antigen presentation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2021;197(July 2020):111378. doi:10.1016/j.colsurfb.2020.111378
 231. Shae D, Becker KW, Christov P, et al. Endosomolytic polymersomes increase the activity of cyclic dinucleotide STING agonists to enhance cancer immunotherapy. *Nat Nanotechnol.* 2019;14(3):269-278. doi:10.1038/s41565-018-0342-5
 232. Suarato G, Li W, Meng Y. Role of pH-responsiveness in the design of chitosan-based cancer nanotherapeutics: A review. *Biointerphases.* 2016;11(4):04B201. doi:10.1116/1.4944661
 233. Golombek SK, May J-N, Theek B, et al. Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018;130:17-38. doi:10.1016/j.addr.2018.07.007
 234. Laoui D, Keirsse J, Morias Y, et al. The tumour microenvironment harbours ontogenically distinct dendritic cell populations with opposing effects on tumour immunity. *Nat Commun.* 2016;7:1-17. doi:10.1038/ncomms13720
 235. Bueter CL, Lee CK, Rathinam VAK, et al. Chitosan but not chitin activates the inflammasome by a mechanism dependent upon phagocytosis. *J Biol Chem.* 2011;286(41):35447-35455. doi:10.1074/jbc.M111.274936
 236. Bueter CL, Lee CK, Wang JP, Ostroff GR, Specht CA, Levitz SM. Spectrum and mechanisms of inflammasome activation by chitosan. *J Immunol.* 2014;192(12):5943-5951. doi:10.4049/jimmunol.1301695
 237. Fong D, Grégoire-Gélinas P, Cheng AP, et al. Lysosomal rupture induced by structurally distinct chitosans either promotes a type 1 IFN response or activates the inflammasome in macrophages. *Biomaterials.* 2017;129:127-138. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.03.022
 238. Verma V, Shrimali RK, Ahmad S, et al. PD-1 blockade in subprimed CD8 cells induces dysfunctional PD-1+CD38hi cells and anti-PD-1 resistance. *Nat Immunol.* 2019;20(9):1231-1243. doi:10.1038/s41590-019-0441-y
 239. Beltra JC, Manne S, Abdel-Hakeem MS, et al. Developmental Relationships of Four Exhausted CD8+ T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms. *Immunity.* 2020;52(5):825-841.e8. doi:10.1016/j.immuni.2020.04.014
 240. Chatterjee S, Thyagarajan K, Kesarwani P, et al. Reducing CD73 expression by IL1 β -Programmed Th17 cells improves immunotherapeutic control of tumors.

- Cancer Res.* 2014;74(21):6048-6059. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1450
241. Dulos J, Carven GJ, Van Boxtel SJ, et al. PD-1 blockade augments Th1 and Th17 and suppresses Th2 responses in peripheral blood from patients with prostate and advanced melanoma cancer. *J Immunother.* 2012;35(2):169-178. doi:10.1097/CJI.0b013e318247a4e7
 242. Kim KH, Hur JY, Cho J, et al. Immune-related adverse events are clustered into distinct subtypes by T-cell profiling before and early after anti-PD-1 treatment. *Oncoimmunology.* 2020;9(1):1-12. doi:10.1080/2162402X.2020.1722023
 243. Saito R, Sawada Y, Nakamura M. Immune profile analysis in peripheral blood and tumor in patients with malignant melanoma. *Int J Mol Sci.* 2021;22(4):1-12. doi:10.3390/ijms22041957