



**“Activación del sensor IRE1 α de la Respuesta a proteínas mal plegadas
(“*Unfolded protein response*”, UPR) en células dendríticas
intratumorales”**

Tesis
Entregada a La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De

Magíster en Ciencias Biológicas
(Con Mención en Biología molecular, Celular y Neurociencias)

Facultad De Ciencias

Por

Sandra Verónica Gaete González
Marzo, 2019

Director de Tesis Dra:

María Rosa Bono y co-tutor Fabiola Osorio

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

Sandra Gaete González

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con Mención en Biología molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 22 de Marzo del 2019

Director de Tesis:

Dra. María Rosa Bono

Co-Director de Tesis:

Dra. Fabiola Osorio Olivares

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. María Rosa Bono

Dra. María Inés Becker

Dr. Álvaro Glavic Maurer

A mi familia y amigos, en especial a mi esposo Cristian, quienes me han entregado su contención, amor y confianza en los momentos más difíciles de este proceso.

RESUMEN BIOGRÁFICO



Soy Sandra Gaete González, nacida en Rancagua en el año 1988, donde viví con mis padres hasta los 18 años. Luego me mudé a Valparaíso donde me titulé de Bioquímica de la Pucv, carrera que me interesó debido a un trasplante de hígado que le hicieron a mi madre. Me trasladé a Santiago por trabajo, donde fui asistente de investigación en la PUC por casi dos años. Luego decidí hacer un Magister para acercarme nuevamente a la inmunología. En mi tiempo libre me dedico a entrenar y a enseñar Karate, disciplina que me apasiona desde pequeña y que le da sentido a todo lo que hago.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres Carlos Gaete y Rudy González que me dieron la educación y todo el amor para tener la fuerza de alcanzar mis metas, y a toda mi familia en especial a mi hermana Rudy Gaete por su cariño.

A mi compañero de vida y esposo Cristian Caifal por ser un pilar fundamental y mi principal apoyo emocional en todos mis proyectos.

También a mis amigos del colegio María Catalina Villarroel, Bárbara Urrutia y José Zavala por continuar en mi vida dándome el mismo cariño de siempre.

A mis amigos de karate por compartir una misma pasión y entrenar conmigo con tantas ganas, y en especial a mis Sensei Mario Díaz y Ricardo Fernández por aguantarme tantos años y entregarme tanto. También a todos los grandes maestros que he ido conociendo a lo largo de una vida de entrenamiento, en especial a Nelson Bustos y Daniel Soto.

A mis amigos de la universidad, compañeros de carrete, felicidad y sufrimiento.

Y finalmente a todos mis compañeros de laboratorio que hicieron mejor esta experiencia con su compañía y enseñanzas, y en especial a mi co-tutora Fabiola Osorio que creyó en mí y me apoyo desde el inicio al final de todo este proceso, y a la profesora María Bono por sus enseñanzas y consejos.

ÍNDICE

ABSTRACT	1
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	6
<i>Subtipos de DCs y su identificación</i>	6
<i>UPR y su regulación de la función de DCs</i>	9
<i>Rol de DCs en cáncer</i>	12
<i>Cáncer y UPR</i>	15
<i>Racional</i>	18
<i>Hipótesis del trabajo</i>	18
<i>Objetivo general</i>	19
Objetivos específicos	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
<i>Líneas celulares</i>	20
<i>Ratones</i>	20
<i>Inyección de tumores</i>	21
<i>Procesamiento y purificación de tumor, bazo y linfonodo drenante de tumor (TdLN)</i>	22
<i>Citometría de flujo multiparamétrica (CF) y cell Sorting</i>	22, 23
<i>Extracción ARN, Síntesis de cDNA</i>	24
<i>PCR para el splicing de XBP-1</i>	24
<i>qPCR en tiempo real</i>	24, 25
<i>Análisis estadístico</i>	25
RESULTADOS.....	26
DISCUSIÓN	50
RECURSOS MATERIALES Y FINANCIAMIENTO	55

REFERENCIAS	56
ANEXO	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fenotipo, origen y ubicación de los subtipos de DCs de ratón de tejido linfoide y no linfoide.	8
Figura 2. Validación de ratones reporteros ERAI “ER stress-activated indicator	28
Figura 3. Poblaciones cDC1 y cDC2 de Tumor y TdLN analizadas.	30
Figura 4. Activación vía IRE1 α en cDC1 y cDC2 en Tumor y TdLN.....	32
Figura 5. Relación de la activación de la vía IRE1 α y la Inducción inmunogenicidad en cDC1 de Tumor.	35
Figura 6. Poblaciones cDC1 y cDC2 de Tumor analizadas.....	37
Figura 7. Poblaciones cDC1 y cDC2 de TdLN analizadas..	38
Figura 8. Expansión poblaciones de cDCs en Tumor B16-Flt3l y TdLN.	40
Figura 9. Expansión poblaciones de cDCs en Tumor B16-Flt3L.....	42
Figura 10. Expresión de genes de linaje de cDC1 y cDC2 residentes y migratorias de TdLN sorteadas.....	44
Figura 11. Expresión de genes asociados a UPR y RIDD en cDC1 y cDC2 sorteadas de Tumor B16-Flt3 y TdLNs	47
Figura 12. Activación eje IRE1 α /Xbp1s según splicing de Xbp1 en cDCs sorteadas de tumor y TdLN..	49
Figura 13. Modelo propuesto: Mayor splicing de XBP-1 y mayor activación de RIDD en cDC1 intratumorales y su disminución tras migrar a TdLN.	54

LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura suplementaria 1. Esquema del eje IRE1 α de la UPR.	61
Figura suplementaria 2. Relación de la activación de la vía IRE1 α y la Inducción de inmunogenicidad en cDC1 Migratorias de TdLN.....	62
Figura suplementaria 3. Relación de la activación de la vía IRE1 α y la Inducción de inmunogenicidad en cDC1 Residentes de TdLN.....	63
Figura suplementaria 4. Relación de la activación de la vía IRE1 α y la Inducción de inmunogenicidad en cDC1 y cDC2 de TdLN	64
Figura suplementaria 5. Expansión poblaciones de cDCs en TdLN de ratones con tumor B16-Flt3l.....	65

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Fenotipo, origen y ubicación de los subtipos de DCs de ratón de tejido linfoide y no linfoide	8
Tabla 2 Marcadores empleados para la identificación de DCs en bazo y TdLN	22
Tabla 3. Marcadores empleados para la identificación de DCs en tumor	23
Tabla 4. Primers utilizados para qPCR.....	24, 25

LISTA DE ABREVIATURAS, CANTIDADES Y SÍMBOLO DE LAS UNIDADES DE MEDIDA

Longitud	Metro	m, mm, μ m, nm, etc.
Volumen	litro	L, ml, μ l, etc.
Tiempo	Hora	h, min, s, ms, μ s
Masa	kilogramo	Kg, g, mg, μ g
Concentración	mol/l	M, mM, μ M,
Masa molecular	daltons	Da, kDa
Tamaño molecular	pares de bases	Pb, Kpb
Temperatura	grados Celsius	$^{\circ}$ C
MFI	intensidad media de fluorescencia	u.a
TdLN	linfonodo drenante de tumor	
DCs	células dendríticas	
cDCs	células dendríticas convencionales	
cDC1	células dendríticas convencionales tipo 1	
cDC2	células dendríticas convencionales tipo 2	
Tg	transgénico	
XBP-1s	XBP-1 <i>spliced</i>	
XBP-1u	XBP-1 <i>unspliced</i>	
UPR	<i>Unfolded Protein response</i>	
ERAI	<i>ER stress Activated Indicator</i>	
RE	retículo endoplasmático	
RIDD	<i>regulated IRE1α dependent decay</i>	
Ags	Antígenos	
Venus FP	proteína fluorescente Venus	
ERAD	vía degradación asociada a RE	
CTL	linfocito T citotóxico	
OVA	ovoalbúmina	
WT	<i>wild type</i>	
KO	<i>knock out</i>	
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	
qPCR	PCR cuantitativo en tiempo real	
TF	Factor de transcripción	
CF	citometría de flujo	

ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) have emerged as attractive candidates in the cancer immunotherapy field due to their high plasticity and the capacity to regulate adaptive immunity.

As a major organelle responsible of protein synthesis, the endoplasmic reticulum (ER) represents a central hub of the immune response onset, as it contributes to key immunological processes including the regulation of the antigen presentation routes, the differentiation of secretory immune cells, and the control of inflammation, by means of cytokine production. Remarkably, tumor cells grow at expenses of the host and imposes a high degree of cellular stress. A relevant cellular stress in cancer relates to the accumulation of unfolded proteins in the ER lumen of tumor-infiltrating immune cells, causing ER stress and activating an intracellular signaling cascade known as the Unfolding Protein Response (UPR). The UPR is a three-pronged signal transduction pathway responsible to maintain protein homeostasis in the ER, and it has shown to control crucial processes in the biology of DCs including ER architecture, expression of integrins and antigen presentation. Therefore, manipulation of UPR could be a rising strategy to modulate DCs function during the activation of the antitumoral immune response.

In this thesis work, we studied how the tumor niche activates the UPR branch controlled by the sensor IRE1 α and its transcription factor XBP-1s, in DCs infiltrating tumors and tumor draining lymph nodes (TdLNs), in a murine model of melanoma induced by inoculation of B16-OVA cells. For this purpose, we used two approaches: First we identified cDC1 and cDC2 cell subtypes with an active IRE1 α RNase activity at the tumor and TdLNs of mice, by an strategy of multiparametric 14-colors flow cytometry and the use of a transgenic mice line, ERAI (ER stress Activated Indicator^[1]). ERAI mice carry the mRNA sequence of XBP-1s, which is spliced by IRE1 α , fused to Venus FP, allowing the quantification of the activation of IRE1 α in vivo. Second, we quantified the expression of XBP-1s and RIDD target genes in sorted intratumoral DCs, which allowed the quantification of the activation of the IRE1 α -XBP-1s and the IRE1 α -RIDD axis.

Our results indicate that high levels of IRE1a RNase activity is selectively induced in the intratumoral cDC1s lineage of DCs. The outcome of this activation was evidenced by enhanced ERAI signal, high amounts of XBP-1s mRNA and decreased expression of RIDD targets, which was selectively noticed in the tumor site compared to the draining lymph node. These data indicate that the tumor site elicit strong activation of IRE1a RNase activity in cDC1, which is the most immunogenic antigen presenting cell type infiltrating Tumors. Current work is focused on unveiling which branch of IRE1 RNase regulates the acquisition of an immunogenic profile in tumor cDC1.

RESUMEN

Las células dendríticas (DCs) han surgido como atractivas candidatas en inmunoterapia del cáncer, debido su alta plasticidad y a su capacidad de regular la inmunidad adaptativa.

Siendo el principal organelo responsable de la síntesis de proteínas, el retículo endoplasmático (RE) es un foco central en el inicio de la respuesta inmune, ya que contribuye a procesos inmunológicos claves que incluyen la regulación de rutas de presentación de antígenos, la diferenciación de células inmunes de naturaleza secretora, y el control de la inflamación mediante la producción de citoquinas. Notablemente, el crecimiento de diversos tipos de tumores expone señales capaces de inducir la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE de células inmunes, lo que origina estrés de RE, activando una cascada de señalización intracelular conocida como respuesta a proteínas mal plegadas o UPR por su sigla en inglés "*Unfolded Protein Response*". La UPR es una vía transducción de señales de tres ejes responsable de mantener la homeostasis proteica en el RE, ya que ha demostrado controlar procesos cruciales en la biología de las DCs tales como la arquitectura del RE, expresión de integrinas y presentación antigénica. Por esta razón, la manipulación de la UPR podría ser una estrategia prometedora para modular la función de DCs durante la activación de la respuesta inmune anti-tumoral.

En este trabajo, se estudió cómo el nicho del tumor activa el eje de la UPR controlado por el sensor IRE1 α y su factor de transcripción XBP-1s, en DCs infiltrantes de tumor y linfonodo drenante de tumor (TdLN) en un modelo murino de melanoma inducido vía inoculación de células B16-OVA de melanoma. Para ello, el trabajo se centró en dos enfoques: Primero se identificaron los subtipos cDC1 y cDC2 que presentaron una activación de la actividad RNasa de IRE1 α en el tumor y TdLN mediante citometría de flujo multiparamétrica de 14 colores empleando los ratones transgénicos, ERAI (ER stress Activated Indicator^[1]). Los ratones ERAI contienen la secuencia de XBP-1s, la cual es cortada por IRE1 α , fusionada a Venus FP, permitiendo la cuantificación de la activación de la enzima *in vivo*. Segundo, se cuantificó la expresión de genes blanco de XBP-1s y de RIDD en DCs sorteadas de tumor y TdLN, lo cual permitió la cuantificación de la activación de los ejes IRE1 α -XBP-1s y IRE1 α -RIDD.

Nuestros resultados indican altos niveles de actividad RNasa de IRE1a selectivamente en el linaje cDC1s de DCs intratumorales. La consecuencia de esta activación fue evidenciada en una señal ERAI aumentada, cantidades elevadas de ARNm de XBP-1s y disminuida expresión de mRNAs blanco de RIDD, lo cual fue observado de manera selectiva en tumor en comparación a linfonodo drenante. Estos datos indican que el nicho tumoral induce una fuerte activación de la actividad RNasa de IRE1a en cDC1, la cual corresponde a la célula presentadora de antígenos más eficiente de las infiltrantes de tumores. Nuestro trabajo actual está focalizado en identificar cuál rama de la

actividad RNasa de IRE1 regula la adquisición de un perfil inmunogénico en las cDC1 de tumor cDC1.

INTRODUCCIÓN

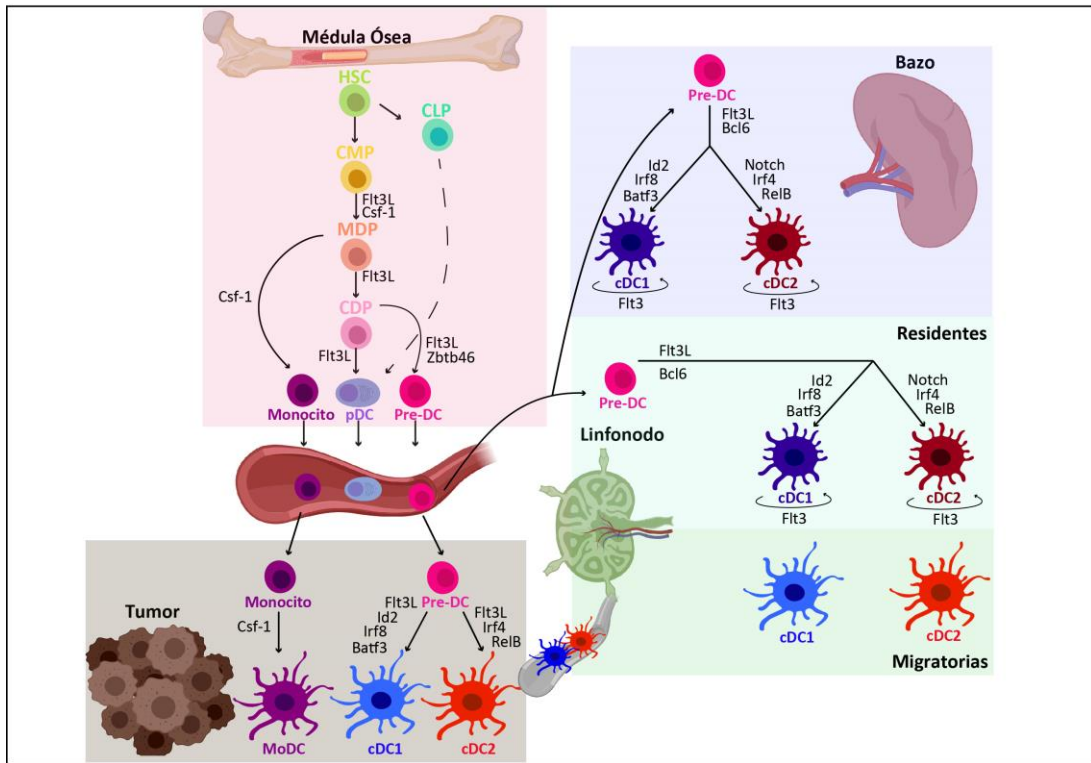
Las células dendríticas (DCs) son reguladoras claves de la respuesta inmune. Se ubican en tejidos y órganos linfoides, en donde detectan, capturan y procesan Antígenos (Ags), los que son presentados en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) a linfocitos T [2-6], a través de lo cual son capaces de inducir una respuesta inflamatoria o tolerogénica, según las señales del medio que detectan del medio [2, 4-7]. Debido a su relevancia en inmunoterapia, los mecanismos intracelulares responsables de regular la función de DCs son hoy blanco de extensa investigación. Frente a amenazas de diversa naturaleza, las DCs son capaces de activarse y adquirir un fenotipo efector, lo cual es regulado por procesos metabólicos y celulares necesarios para mantener la biosíntesis y la demanda energética acorde a una correcta función celular[4, 7].

Subtipos de DCs y su identificación: Las DCs son una población heterogénea de leucocitos que expresan diversos marcadores de superficie dependiendo de su ontogenia, ubicación en diversos tejidos y función [6-9]. En general, las DCs expresan constitutivamente los marcadores hematopoyéticos CD45, MHC-II, y CD11c; y a su vez carecen de marcadores de linaje de células T, Natural Killer, células B, granulocitos y eritrocitos. Se han identificado diferentes subtipos de DCs: 1) DCs plasmocitoides (pDCs) que producen enormes cantidades de interferón alfa (INF- α) tras la exposición a un estímulo viral; 2) DCs derivadas de monocitos (moDCs) las cuales solo emergen en inflamación, y; 3) DCs convencionales (cDCs) (Figura 1), las que se pueden subdividir en

dos subtipos denominados cDC1 y cDC2, que difieren en ontogenia, fenotipo y función^[4, 5, 7, 8] [2, 5-7, 9]. Las pDCs y las cDCs provienen de un precursor en común en la médula ósea (CDP, *common DC progenitor*) y su desarrollo depende de la citoquina Flt3L^[5-7, 10, 11]. Además de su clasificación, existen DCs asociadas a tejidos que migran hacia los linfonodos, caracterizadas por la expresión de marcadores de superficie específicos, y que difieren de las DCs residentes de linfonodo (Figura 1)^[7, 11-13].

Respecto de las cDCs, las cDC1 expresan el receptor de quimioquina XCR1, y dependen de los factores de transcripción (TF) Batf3, IRF8 y Id2 para su desarrollo (Figura 1, Tabla 1) [2-5, 7-9, 14-16]. Dependiendo del lugar de residencia, las cDC1s residentes de órganos linfáticos expresan el marcador CD8 α , y las cDC1 migratorias o presentes en tejidos periféricos expresan la integrina CD103 (α E) [7, 13]. Por su parte, las cDC2s expresan los marcadores Sirp α y CD11b, y requieren los TF Notch2, RelB, Zeb2, klf4 y IRF4 para su desarrollo (Figura 1, Tabla 1) [2, 9, 17-20].

En cuanto a función, las cDC1s se especializan en activar linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs), debido a que realizan eficientemente la presentación cruzada de antígenos, mecanismo por el cual Ags exógenos acceden a la vía de presentación en MHC-I [5, 21]. Además, las cDC1 fagocitan células muertas de forma muy competente y son también fuente esencial de IL-12 *in vivo*, permitiendo la diferenciación de células T CD8⁺ y Th1 [2, 3, 5], lo que las convierte en reguladores clave de la inmunidad anti-tumoral y anti-viral, y un foco central de las vacunas basadas en DCs^[10, 22, 23].



Fenotipo de DCs de ratón de tejido linfoide y no linfoide



Marcador fenotípico	pDC	cDC de tejido linfoide		cDC de tejido no linfoide			MoDCs
		CD8 ⁺ cDC1	CD11b ⁺ cDC2	CD103 ⁺ CD11b ⁻ cDC1	CD103 ⁺ CD11b ⁺ cDC intestinal	CD103 ⁻ CD11b ⁺ cDC2	
CD45	+	+	+	+	+	+	+
CD11c	+	+++	+++	++	++	++	++
MHC class II	+	++	++	++	++	++	++
CD8	subset	+	-	-	-	-	-
CD4	+	-	+/-	-	-	-	-
CD11b	-	-	+	-	+	+	+
CD103	-	subset	-	++	++	-	-
CD172a (Sirpa)	+	-	++	-	-	++	+
Xcr1	-	+	-	+	-	-	+
B220	+	-	-	-	-	-	-
CD24	ND	++	+	++	++	+/-	+
F4/80	-	-	+	-	-	+	+
Ly6C	++	-	-	-	-	+/-	++

Figura 1 y Tabla 1. Fenotipo, origen y ubicación de los subtipos de DCs de ratón de tejido linfoide y no linfoide. Se muestran el fenotipo, origen y ubicación de los subtipos cDC1 y cDC2 de tumor, bazo, y linfonodo (migratorias y residentes), según los marcadores y tejidos analizados en este estudio. Se indican algunos factores de transcripción importantes para la transición de un estadio a otro en el desarrollo. Figura basada en [7]

Por otro lado, se ha reportado que la respuesta de linfocitos T CD4⁺ Th2 y Th17 frente a hongos, alérgenos y otros ocurre preferentemente gatillada por cDC2 [2, 3, 18]. Es por estas diferencias, que la contribución de los subtipos cDC1 y cDC2 en condiciones de salud y enfermedad requiere ser estudiada con profundidad.

La respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) y su regulación de la función de DCs: La UPR es un regulador relevante de la función de DCs [24]. El RE es el organelo encargado de la síntesis, plegamiento y maduración de proteínas de secreción o de membrana, exportando proteínas plegadas correctamente a la vía secretora, y eliminando a aquellas mal plegadas mediante la vía de degradación asociada a RE (ERAD) o por autofagia [25]. En las DCs, el RE contribuye a procesos relacionados con la presentación de Ags, como la regulación del tráfico antigénico y la carga de Ags en moléculas MHC-I [24, 26]. Varios estímulos inflamatorios que activan a las DCs, tales como hipoxia, estrés celular, y exceso crónico de factores metabólicos, desencadenan estrés de RE [24], debido a un desbalance entre la síntesis y la carga proteica, causando acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE. Este estrés de RE gatilla la UPR, que es controlada por tres sensores presentes en la membrana del RE: IRE1 α , PERK y ATF6 α [25, 27, 28]. La vía más conservada es la mediada por la proteína IRE1 α (proteína de transmembrana, con un dominio quinasa y RNasa en su cara citosólica), que se mantiene inactiva en su forma de monómero gracias a la unión de la chaperona BiP (*Binding immunoglobulin protein*). Durante estrés de RE, BiP es reclutada por proteínas mal plegadas, e IRE1 α se activa, induciendo cambios conformacionales que conllevan a su dimerización y trans-

autofosforilación [25, 27, 29-31]. Tras su activación, IRE1 α corta el intrón de 26 nucleótidos del ARNm del TF XBP-1 por un proceso de *splicing* alternativo convirtiéndolo desde XBP-1u (*unspliced*) en un factor de transcripción potente denominado XBP-1s (*spliced*), el cual regula genes de la UPR relacionados con lipogénesis, plegamiento proteico, ERAD, integridad de RE y supervivencia celular, los cuales incrementan la biogénesis de los componentes estructurales y chaperonas residentes del RE, aumentando así su tamaño y función (Figura suplementaria 1) [25, 27, 29-31]. Si no se logra restaurar la homeostasis proteica, se origina un estrés de RE crónico, el que activa una vía alterna de señalización: la UPR terminal, mediada por PERK e IRE1 α , que bajo estas condiciones activan genes pro-apoptóticos y/o inhiben genes anti-apoptóticos como BCL-2, promoviendo muerte celular [25, 28, 30]. Durante este proceso, la hiperactivación de IRE1 α desencadena la formación de oligómeros de alto orden que refuerzan la actividad RNasa de IRE1 α . Esto favorece el procesamiento de otros sustratos además de XBP-1, en un proceso llamado “decaimiento regulado de ARNMs dependiente de IRE1 α ” (RIDD por su sigla en inglés “*regulated IRE1 α dependent decay*”), contribuyendo así a disminuir la tasa de síntesis proteica y con esto, a aliviar el estrés de RE [25, 29, 30, 32]. Dentro de los genes blanco de RIDD se encuentran *Bloc1s1*, componente del complejo BLOC-1; *Ergic3*, proteína asociada a el tráfico de vesículas del RE al Golgi; y *Tapbp*, proteína de unión TAP involucrada en la presentación de Ag vía MHC-I^[33-35].

Mientras que el *splicing* del ARNm de XBP-1 suele ser citoprotector durante estrés de RE, RIDD corta ARNMs en un sitio consenso “*XBP-1-like*” con una actividad divergente

que puede preservar la homeostasis del RE para mediar supervivencia o promover muerte celular^[32, 36]. Actualmente, se ha propuesto un nuevo mecanismo que podría regular la transición desde una UPR adaptativa a una citotóxica. Este mecanismo considera la participación de XBP-1, bajo condiciones de estrés de RE, en la activación del factor de transcripción KLF9 (*kruppel-like factor 9*) mediante uno de los sitios de unión putativos de XBP-1s, (UPRe, elemento consenso de la UPR (TGACGTG(G/A)))^[37]. La sobre-expresión de KLF9 demostró requerir de mayores cantidades de XBP-1s en comparación a otros de sus genes blancos, y resultó en la exacerbación de estrés de RE por el aumento de la expresión de los canales de calcio TMEM38B y ITPR1, favoreciendo la liberación de calcio y la muerte celular ^[38].

Los genes blanco de XBP-1s varían según tejido y estímulo, ya que puede interactuar con otros TFs formando de heterodímeros. Algunos de los principales genes blanco de XBP-1s son *Edem1*, manosidasa esencial para ERAD; *Erp44*, proteína del control calidad de RE; así como también *Rpn1*, *Rpn2*, *erdj4*, *ero1L*, *p58lpk* y *Dnajc10*; entre otros ^[26, 27]. Cabe destacar que, bajo condiciones de estrés de RE prolongado, XBP-1u *unspliced* puede regular negativamente XBP-1s, debido a que al acumularse, dimeriza con XBP-1s y promueve su degradación mediada por proteosoma ^[27].

En el sistema inmune, el eje IRE1 α ha surgido como un regulador crucial de la fisiología celular en células secretoras como células plasmáticas ^[39], eosinófilos ^[40] y DCs ^[27, 41, 42]. Estudios en modelos de ratones transgénicos (Tg) con delección de XBP-1 muestran que este eje controla la producción de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos ^[43], la

diferenciación de DCs [26] y el desarrollo de células plasmáticas [42]; destacando su rol en la inducción de respuestas inmunes. En las DCs, existe una activación preferencial y constitutiva de IRE1 α en diversos tejidos. Estas células, son altamente sensibles a variaciones en los niveles de IRE1 α y Xbp1s, lo que las hace candidatas interesantes para estudiar la relación entre UPR e inmunidad [26, 44], por ejemplo mediante el análisis del grado de activación de este eje en contextos tumorales o de inflamación. Esta activación difiere entre subtipos, ya que las cDC1s activan el eje IRE1 α de manera constitutiva, a diferencia de las cDC2s que lo activan en menor grado. En las cDC1, IRE1 α regula aspectos claves como la arquitectura del RE; desarrollo celular, expresión del marcador arquetípico CD11c; supervivencia de cDC1s en la mucosa y presentación de Ags a células T CD8⁺ [26, 44, 45]. Mediante la actividad transcripcional de XBP-1, IRE1 α regula la expresión de genes involucrados en la homeostasis del RE; mientras que RIDD degrada ARNms implicados en presentación cruzada [24, 26, 44]. En resumen, se conocen varios mecanismos por los que la UPR se relaciona con las DCs en condiciones sanas, pero poco se sabe sobre estos mecanismos bajo desafío tumoral; conocimiento muy relevante para la inmunoterapia del cáncer.

Rol de DCs en cáncer: La inmunoterapia contra el cáncer explota mecanismos inmunes con el objetivo de prevenir el crecimiento tumoral. La eliminación de células tumorales depende en gran parte de la generación de CTLs, capaces de reconocer específicamente estas células a través de la interacción TCR-MHC-I, e inducir su muerte [22]. Así, la abundancia de CTLs en el sitio tumoral se asocia a un pronóstico positivo en muchos

tipos de cáncer [46, 47]. En esta línea, el sistema inmune sólo es capaz de inducir CTLs a través de la presentación de Ags tumorales por parte de una DC competente, activada, capaz de sensor, procesar el antígeno tumoral y migrar hacia el linfonodo drenante del tumor, donde lo presentará a linfocitos T vírgenes, induciendo su diferenciación hacia perfiles T efectores. Por este motivo, las DCs juegan un rol clave en la respuesta anti-tumoral, y el tipo de respuesta inmune gatillada por estas células, dependerá del estadio del tumor, tipo de cáncer, y del subtipo de DC estudiado [48].

Las principales evidencias sobre el rol esencial de las cDC1 en la generación de CTL anti-tumorales y en regresión tumoral [4, 49], provienen de estudios en melanoma [50, 51]. La alta eficiencia con que las cDC1s realizan presentación cruzada al migrar al TdLN, permite la presentación eficaz de Ags derivados de células tumorales muertas para el “*priming*” de CTLs [49-51]. Se sabe también que, dentro del nicho tumoral, las cDC1 son potentes estimuladores de la proliferación de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, y que los tumores regresivos tienen mayor proporción de cDC1s [4, 49]. De hecho, se ha reportado que en ratones la expansión de cDC1s dentro del nicho tumoral de melanoma administrando Flt3L, conduce a la eliminación eficiente del tumor [11]. Adicionalmente, el crecimiento de tumores singénicos de fibrosarcoma se ve favorecido en ratones deficientes de Batf3 que no son capaces de generar cDC1s [15]. Así, la presencia de cDC1s se asocia a señales positivas de supervivencia en varios tipos de cáncer, que, además, correlacionan con la sobre-expresión de genes característicos de este linaje [10, 49]. De

esta manera las cDC1s son predictoras de buen pronóstico en cáncer humano, y de una respuesta positiva a la inmunoterapia anti-PD-1 en pacientes de melanoma^[49].

Por otra parte, la contribución de las cDC2 en supervivencia tumoral ha sido menos explorada. Estudios en modelos murinos de cáncer ovárico, un modelo que recluta preferencialmente DCs del tipo cDC2, indican que la presencia de este tipo celular inhibe la actividad anti-tumoral de linfocitos T ^[52, 53]. Más aún, la eliminación de cDC2 en tumores ováricos previene su progresión ^[52]. Adicionalmente, las cDC2 han demostrado ser ineficaces en presentar antígenos tumorales a linfocitos T CD8+ en modelos de melanoma murino^[10].

Los tumores evaden el control inmune mediante la generación de microambientes hostiles que perturban el metabolismo de los linfocitos T y su función efectora. Uno de estos mecanismos de evasión es a través de la modulación de la maduración y actividad de las DCs, induciendo fenotipos tolerogénicos o inmunosupresores como PDL-1 y afectando la normal expresión de marcadores de superficie como CD80 y CD86 ^[54, 55]. Por ejemplo, al inducirse la expresión de ciertas moléculas inmuno-reguladoras como PD-L1 en las DCs, se pueden silenciar activamente linfocitos T efectoras^[2]. Lo descrito anteriormente demuestra que el linaje cDC1 presenta características únicas al mantener sus propiedades inmunogénicas dentro del nicho tumoral, convirtiéndolas en candidatas para intervenciones inmunoterapéuticas en cáncer. Las células cDC2, en cambio, sucumben a los efectos tolerogénicos del tumor ^[10, 52, 53]. En resumen, los linajes cDC1 y cDC2 tienen roles opuestos en la generación de la respuesta inmune antitumoral, la que

es dependiente del tipo de cáncer, lo que hace necesario un estudio en profundidad de la función de los diversos subtipos de DCs en la generación de estas respuestas.

Cáncer y UPR: Los mediadores del estrés de RE ejercen diversas funciones en inmunidad, y una desregulación de la UPR puede derivar en patología. Estas funciones incluyen la defensa anti-microbiana, la producción de citoquinas pro-inflamatorias, y la presentación de Ags a células T, entre otras [56].

En contextos tumorales, se ha sugerido que el crecimiento del tumor se ve favorecido por la propagación de estrés de RE desde células tumorales a leucocitos circundantes, mediante la secreción de un factor resistente al calor, que es decodificado mediante el receptor de reconocimiento de patrones TLR4[57]. Este concepto de estrés de RE 'transmisible' también se ha observado en DCs cultivadas en presencia de medio condicionado derivado de células tumorales sometidas a estrés de RE, con una consecuente respuesta inmunosupresora y el fomento del crecimiento del tumor *in vivo*[58].

La magnitud del estrés de RE define el desarrollo de una respuesta inmunogénica o inmunosupresora[59]. Con el fin de ajustar su capacidad de plegamiento proteico y asegurar su supervivencia en las hostiles condiciones del microambiente tumoral, las células tumorales explotan la vía IRE1 α -XBP1 de la UPR[59-61]. En este contexto, la activación constante de IRE1 α -XBP1 en células tumorales promueve el crecimiento del tumor y metástasis *in vivo* en diversos tipos de cánceres agresivos [60-62]. Además, se ha visto

que terapias anti-tumorales como la quimioterapia también modulan la UPR, aunque las implicaciones clínicas de esto recién comienzan a ser estudiadas^[59].

Por otra parte, dada su importancia, el rol de la UPR en DCs intratumorales está comenzando a ser estudiado. En el modelo de cáncer ovárico se ha reportado que DCs asociadas a tumor presentan alta activación de la UPR, en particular de la vía mediada por IRE1 α /XBP-1, por un mecanismo dependiente de la acumulación de lípidos peroxidados ^[53]. Importantemente, en este modelo de cáncer ovárico, la activación de IRE1 α /XBP-1 en DCs tumorales (que corresponden principalmente al tipo cDC2s) tiene un efecto supresor de la respuesta inmune, ya que el silenciamiento del TF XBP-1 en estas células restablece la función inmunogénica de cDC2s y aumenta la respuesta linfocitaria, traduciéndose en un aumento en la sobrevida ^[53]. En este mismo modelo de cáncer ovárico, el tratamiento de ratones WT con nanopartículas silenciadoras de IRE1 α o de XBP-1 reflejó en ambos casos en un mayor porcentaje de sobrevida con respecto al grupo control. No obstante, el porcentaje de sobrevida entre ambos tratamientos fue similar, con lo cual se sugiere que IRE1 α a través de XBP-1s, más que a través de RIDD, es responsable del efecto inmunosupresor de la respuesta antitumoral ^[53]. Por lo tanto, en este modelo de cáncer, que corresponde a un modelo que excluye cDC1 al reclutar preferencialmente cDC2, la activación del eje IRE1 α /XBP-1 posee un papel inmunosupresor que lo convierte en un blanco interesante de inmunoterapias para este tipo de neoplasias. Esto sugiere que el eje IRE1 α /XBP-1 podría tener un papel inmunoregulador igual de relevante otros subtipos de DCs como las cDC1s asociadas a

tumor, en las cuales se desconoce la función de la UPR y que presentan características funcionales opuestas a cDC2s y que además presentan activación constitutiva de IRE1 α ^[26].

Por lo tanto, si bien estos son resultados a tomar en cuenta, se debe destacar que los mecanismos moleculares involucrados en cada tipo celular podrían variar en cuanto a las funciones biológicas mediadas por la señalización por IRE1 α /XBP-1. Recientemente, se ha reportado que ratones con tumores de cáncer ovárico con delección selectiva de XBP-1 en linfocitos T CD4+ y CD8+, demostraron una inmunidad antitumoral superior, un retraso en la progresión tumoral, y un incremento general en supervivencia^[63]. Resultados similares se obtuvieron en ratones con tumores de cáncer ovárico con delección selectiva de IRE1 α en linfocitos T, indicando que la responsable del retraso en la progresión tumoral es la activación canónica de IRE1 α -XBP-1 en estas células, y no una señalización IRE1 α quinasa independiente de XBP-1, o RIDD^[63]. En este mismo estudio se concluyó que esta activación de IRE1 α -XBP-1s en linfocitos T modula la degradación de transportadores de glutamina durante el estrés de RE mediante la activación de ERAD, suprimiendo así la actividad mitocondrial y la producción de INF γ , probablemente con el fin de afectar el metabolismo y función antitumoral de los linfocitos T al limitar la entrada de glutamina requerida para la mantención de una respiración celular adecuada en condiciones de privación de glucosa^[63].

Racional:

1. Las DCs son células reguladoras claves de inmunidad y tolerancia inmune al presentar antígenos en conjunto con transmitir información innata a linfocitos T.

2. Las cDC1s realizan presentación cruzada de antígenos con alta eficiencia para el priming de CTLs, lo cual les otorga un rol clave en la inmunidad anti-tumoral, y las convierte en un foco central de las vacunas basadas en DCs.

3. Por otra parte, la UPR, en particular el eje IRE1 α , ha surgido como un regulador crucial de las cDC1s.

4. La activación constante del eje IRE1 α -XBP1 en células tumorales y algunas células inmunes como cDC2 y linfocitos T, promueve el crecimiento del tumor y metástasis en diversos tipos de cánceres agresivos. Sin embargo, las cDC1, que poseen una activación endógena de este eje, han demostrado efectos contrarios en su respuesta anti-tumoral.

Hipótesis del trabajo: El microambiente del melanoma permite la activación del sensor de la UPR IRE1 α en DCs, en particular de la vía de XBP1s, el cual está asociado con la inmunogenicidad de las DCs presentes en el sitio tumoral.

Objetivo general: Determinar el grado de activación del eje mediado por IRE1 α en subtipos de DCs aisladas de tumores, mediante el uso de un ratón reportero para XBP-1s, en un modelo murino de melanoma.

Objetivos específicos:

1. Determinar si el tumor subcutáneo de melanoma B16-OVA induce la activación de la rama IRE1 α de la UPR en subtipos de DC aisladas desde tumor y nodos linfáticos de ratones reporteros para XBP-1s ERAI.

2. Determinar si activación de la vía IRE1 α induce la inmunogenicidad y la activación canónica de genes de la UPR en DCs tumorales y de nodos linfáticos.

-i. Observar activación de DCs (CD80, CD86, PDL1 y IL-12) en ratones WT e ERAI.

-ii. Identificación genes blanco de XBP1 y de RIDD por qPCR en cDCs sorteadas de tumor y TdLN.

Considerando lo relevante de las cDC1s en la inmunidad antitumoral, y el conocimiento previo del rol de IRE1 α en su función, se planea con este proyecto determinar el grado de activación de este eje de la UPR en DCs en el nicho tumoral. Es crítico entender cómo se regula la UPR en las DCs intratumorales, ya que el eje IRE1 α /XBP1 opera de distinta forma dependiendo del subtipo de DC [26, 53], y su correcta modulación ayudaría a identificar nuevas y prometedoras estrategias clínicas antitumorales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares: Se empleó en este estudio un modelo de melanoma B16-OVA que expresa el antígeno modelo Ovoalbúmina (OVA). Este modelo tumoral es capaz de reclutar ambos linajes de DCs cDC1 y cDC2^[64]; y además, presenta una estricta dependencia de la funcionalidad de las cDC1 ya en que ratones BATF3 KO que carecen del subtipo cDC1 se aprecia un progresivo crecimiento del tumor^[15], mientras que en ratones que presentan mayores niveles de cDC1 se aprecia una disminución del crecimiento del tumor^[11]. Por lo tanto, este modelo nos permite medir la activación de la UPR en los distintos linajes de DCs tumorales. Además, como estrategia para obtener números mayores de DCs en los experimentos de *Cell Sorting*, se usó la línea celular de melanoma B16-Flt3L que produce la citoquina Flt3L y expande cDC1 y cDC2 a nivel sistémico y local^[11, 65, 66]. Las líneas celulares de melanoma necesarias para la realización de este trabajo han sido amablemente donados por la Dra. Daniela Sauma (B16-OVA, Fac. Ciencias U. de Chile), y la Dra. María Rosa Bono (B16-Flt3L, Fac. Ciencias U. de Chile).

Ratones: Se usaron ratones wild type (WT) o reporteros Tg ERAI ("*ER-stress Activated Indicator*", *Figura 1A*), que llevan la secuencia de XBP-1 fusionada a la proteína Venus fluorescente (Venus FP)^[1], lo que permite cuantificar la activación del dominio RNasa de IRE1 α *en vivo* por citometría de flujo (CF), ya que Venus FP sólo fluoresce cuando hay splicing de *Xbp-1*. Además, el uso de animales heterocigotos, que tienen una copia del

transgén XBP1-Venus FP ubicado en el cromosoma 11 en ratones^[1, 67], permite asegurar que un aumento de la señal Venus FP se deba a un aumento en la expresión (*o splicing*) de XBP-1s y no a más copias del transgén. Por otra parte, el monitorear la fluorescencia de la proteína Venus FP elimina el problema que representaría observar directamente XBP-1s, que a pesar de tener una vida media mayor a la de XBP-1u (~22 min vs. ~11 min respectivamente^[68]), sigue siendo baja para su detección luego de los procedimientos a emplear. Esto debido a que las proteínas fluorescentes típicamente tienen vidas medias de 24h^[69]. Los ratones transgénicos ERAI pertenecen al Dr. Takao Iwawaki (Kanazawa University) y fueron obtenidos gracias al Dr. Claudio Hetz (Fac. Medicina U. de Chile). Los animales de experimentación fueron mantenidos en el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, y en el bioterio de Fundación Ciencia & Vida. Toda la experimentación con ratones fue llevada a cabo bajo el protocolo de autorización bioético n° 0871, otorgado por el Comité Institucional de cuidado y uso de animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Inyección de tumores: Los ratones fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de ketamina 1% - xilacina 0,3 % y luego se inocularon con 5×10^5 células B16-OVA o B16-FIt3L. Luego de 14 días desde la inoculación del tumor, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical al tener un tamaño de tumor aproximado de entre 50 a 80 mm³. Se empleó 1 ratón macho por condición para los experimentos con ratones ERAI (tres repeticiones) y 5 ratones hembra WT para cada sorter (tres repeticiones).

Procesamiento y purificación de tumor, bazo y linfonodo drenante de tumor (TdLN): El tumor, el bazo y el linfonodo drenante de tumor (TdLN) fueron disgregados mecánica y enzimáticamente (colagenasa D + DNAsa I, Roche) incubando a 37°C por 30 min o 45 min en solución HBSS (Gibco) + 5% FCS (Gibco) para tumor o en PBS (Gibco) 10% FCS(Gibco) para TdLN y bazo. Luego fueron filtrados a través de nylon cell strainer (70 µm) y centrifugados a 500 g x 5 min. Tumor y bazo fueron resuspendidos en 2 ml de buffer de lisis RBC (Biolegend), incubados por 5 min en hielo, se les añadió 8 ml de HBSS +5% FCS (tumor) o RPMI 10% FCS (bazo) y fueron centrifugados. El bazo fue resuspendido en 10 ml y el TdLN en 5 ml de RPMI 10% FCS para conteo celular. El tumor fue resuspendido en 1 mL de buffer FACS (BD Bioscience) y luego de contar las células se ajustó la concentración a 1×10^8 células/mL. Se enriqueció la población leucocitaria infiltrante de tumor por selección positiva con esferas magnéticas (anti CD45 o anti-PE, Miltenyi).

Citometría de flujo multiparamétrica (CF) y cell Sorting: Las poblaciones de DCs infiltrantes fueron identificadas según los marcadores indicados:

Tabla 2 Marcadores empleados para la identificación de DCs en bazo y TdLN

Subtipo	Lin*	CD11c	MHC-II	XCR1	SIRP- α
cDC1	-	high	High	+	-
cDC2	-	high	High	-	+
Linfocitos T	+	N.A	-	N.A	N.A
Linfocitos B	+	N.A	+	N.A	N.A
cDC1 migratorias	-	int	High	+	-
cDC2 migratorias	-	int	High	-	+
cDC1 residentes	-	high	Int	+	-
cDC2 residentes	-	high	Int	-	+

* Lin corresponde a los marcadores CD3/B220 en el mismo canal de fluorescencia.

Int = intermedia, high = alta expresión del marcador. Además, en todos se marcó viabilidad, PDL-1, CD80 Y CD86, y se detectó Venus-FP en FITC.

Tabla 3. Marcadores para la identificación de DCs en el tumor

Subtipo	CD45	Lin*	CD11b	Ly6C	MHC-II	F4/80	CD24	XCR1	SIRP α
cDC1	+	-	-	-	+	-	hi	+	-
cDC2	+	-	int	-	+	-	hi	-	+
Linfocitos T	+	+	N.A	N.A	-	N.A	N.A.	N.A.	N.A.
Linfocitos B	+	+	N.A	N.A	+	N.A	N.A.	N.A.	N.A.
TAM	+	-	+	-	+	+	-	-	int

* Lin corresponde a los marcadores CD3/B220 en el mismo canal de fluorescencia.

Int = intermedia, high = alta expresión del marcador. Además, en todos se marcó viabilidad, PDL-1, CD80 Y CD86, y se detectó Venus-FP en FITC.

Todos los anticuerpos fueron comprados de eBioscience, Invitrogen, o Biolegend. Para los experimentos con ratones ERAI correspondieron a: PE CD45, PE CD11c, PECy5 CD3, PECy5 B220, PECy7 CD172 α (Sirp α), APCH7 I-A/I-E (MHC-II), BV605 Ly6C, BV650 XCR1, BV785 CD11b, F4/80 biotin (Biolegend); CD11c PECy7, eFluor450 CD24, APC CD86, eFluor450 CD8 (eBioscience); y BV711 CD274 (PD-L1), BUV 395 CD80, BUV 737 SA (BD Bioscience). Mientras que para la realización de los sorter los anticuerpos empleados fueron: Sirp α PECy5, APCH7 I-A/I-E (MHC-II), APC SA, XCR1 PE, CD24 PECy7 F4/80 biotin, Ly6c BV421; CD3 BV510, B220 BV510 (Biolegend); y CD11c APC (eBioscience).

Para la tinción de superficie, las células fueron incubadas con el anticuerpo anti-Fc y marcadas con los anticuerpos correspondientes en tampón FACs por 30 min en hielo. Se empleó como marcador de viabilidad Live/Dead Aqua (Invitrogen) o Zombie green (Biolegend). Para la tinción de IL-12 los ratones fueron inyectados con 10 μ g/g de peso con Brefeldin A (Cayman) 4 hr antes de sacrificar al animal. Se realizó la tinción de células de superficie, y posteriormente se utilizó el kit fixation and permeabilization de eBioscience para tinción intracelular. Toda la citometría de flujo fue realizada en el

citómetro BD LSR FORTESSA X-20 (Facultad de Medicina, UChile) y el *cell sorter* en el equipo BD FACS Aria III (Facultad de Ciencias, UChile).

Extracción ARN, Síntesis de cDNA: Se extrajo el ARN de células cDC1 y cDC2 de TdLN y tumor B16-Flt3L mediante el kit RNeasy Plus Micro de QIAGEN a partir de 3 mil-150 mil células sorteadas. Luego el cDNA se sintetizó mediante el kit M-MLV Reverse Transcriptase de Invitrogen.

PCR para el splicing de XBP-1: Se utilizaron los siguientes primers para la amplificación por PCR: 5'-CTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3' y 5'-TTGCTGATCCACATCTGCTG-3' (para β -actina como control de carga), 5'-ACACGCTTGGGAATGGACAC-3' y 5'-CCATGGGAAGATGTCTGGG-3' (para las secuencias "spliced" del mRNA de XBP-1 [43]); y luego los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2,8% y fueron visualizados con SYBR Safe.

qPCR en tiempo real: Se realizó utilizando el Master Mix Brilliant II SYBR® Green QPCR de Agilent Technologies, en el equipo termociclador para real time-PCR (Roche LightCycler II) (Facultad de Medicina, U. de Chile). La cantidad relativa de mRNA se calcularon utilizando L27 como control.

Tabla 4. Primers utilizados para qPCR

Primer	secuencia	referencia
L27 Fwd	GCCAAGCGATCCAAGATCAA	
L27 Rev	GCTGGGTCCCTGAACACATC	
Xbp-1s Fwd	AAGAACACGCTTGGGAATGG	[70]
Xbp-1s Rev	CTGCACCTGCTGCGGAC	[70]
Erp44 Fwd	GACACAGCCCCAGGAGAG	
Erp44 Rev	TCATCTCGATCCCTCAATAAAGTA	
Edem1 Fwd	AAGCCCTCTGGAAGCTTGCG	[71]
Edem1 Rev	AACCCAATGGCCTGTCTGG	[71]
Bloc1s1 Fwd	CACCCAGCCAGACTCGAC	

Bloc1s1 Rev	GCAGCGATAGCTTCTCTCCTC	
Tapbp Fwd	ACCATTCCCAGGAACTCAAA	
Tapbp Rev	GAGAAGAAGGCTGTTGTTCTGG	
Ergic3 Fwd	GTTCAAGAAACGACTAGACAAGGA	
Ergic3 Rev	ACCTCGACTTTCCCAAGCTC	
Irf8 Fwd	CAGGAGGTGGATGCTTCCATC	[72]
Irf8 Rev	GCACAGCGTAACTCGTCTTC	[72]
Irf4 Fwd	AGATTCCAGGTGACTCTGTG	[73]
Irf4 Rev	CTGCCCTGTCAGAGTATTC	[73]
Zbtb46 Fwd	AGAGAGCACATGAAGCGACA	[74]
Zbtb46 Rev	CTGGCTGCAGACATGAACAC	[74]
Batf3 Fwd	CAGAGCCCCAAGGACGATG	[72]
Batf3 Rev	GCACAAAGTTCATAGGACACAGC	[72]
Id2 Fwd	ATGAAAGCCTTCAGTCCGGTG	[72]
Id2 Rev	AGCAGACTCATCGGGTCGT	[72]

Los primers sin referencia en la tabla 4 corresponden a primers de diseñados con la herramienta online “Universal probe library system assay design” de Roche. (https://lifescience.roche.com/global_en/articles/Universal-ProbeLibrary-System-Assay-Design.html)

Análisis Estadísticos: Para los análisis de la señal VenusFP de los distintos subtipos celulares analizados entre ratones ERAI y WT (un ratón macho por condición), se analizó la Intensidad media de Fluorescencia (MFI) considerando tres repeticiones experimentales, mediante un test-T no pareado con corrección Welch y con 95% de intervalo de confianza hecho con el software Graphpad Prism. Para los análisis de qPCR se hicieron *pools* de 5 ratones WT y se analizó la expresión relativa de cada gen con respecto su housekeeping L27 observando diferencias para cada población celular mediante un test-T no pareado con corrección Welch y con 95% de intervalo de confianza.

RESULTADOS

1. Determinar si el tumor subcutáneo de melanoma B16-OVA induce la activación de la rama IRE1 α de la UPR en subtipos de DC aisladas desde tumor y nodos linfáticos de ratones reporteros para XBP-1s ERAI. En respuesta al primer objetivo cuyo fin fue observar si el tumor subcutáneo de melanoma B16 induce la activación de la rama IRE1 α de la UPR en cDC1 y cDC2 aisladas de tumor y TdLN, en una primera instancia los ratones reporteros ERAI fueron validados midiendo la fluorescencia de Venus FP en células cDC1 y cDC2 de bazo identificadas según la estrategia de gating indicada en la Figura 2B, elaborada previamente en nuestro laboratorio. El uso de esferas magnéticas anti CD45 para enriquecer la población leucocitaria infiltrante consideró que en el tumor existe una gran cantidad de células muertas, debris y contaminantes, y que de esta manera se lograrían ver mejor los subtipos de células dendríticas cDC1 y cDC2 que representan un porcentaje muy bajo de la población celular total dentro del tumor (0.55% cDC1 y ~1% cDC2 de la población leucocitaria total del tumor según datos obtenidos en este laboratorio).

Dentro de las células vivas las poblaciones de cDC1s y cDC2s en bazo fueron definidas como Lin⁻/CD11c^{hi}/MHC-II^{hi}/XCR1⁺ y Lin⁻/CD11c^{hi}/MHC-II^{hi}/Sirp α ⁺, respectivamente, tal y como se indica en la Figura 2B y en la Tabla 2. Al comparar la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) de Venus FP de cada subtipo celular proveniente de ratones ERAI con respecto a su equivalente en ratones WT, se comprobó que existe una diferencia

significativa entre ellas; además se observó, que la MFI de cDC1 es significativamente mayor que la de cDC2 (Figura 2C y 2D), indicando que existe una activación endógena de la vía IRE1 α en las cDCs de bazo, la cual es mayor en cDC1 con respecto a cDC2 tal y como ha sido reportado^[26].

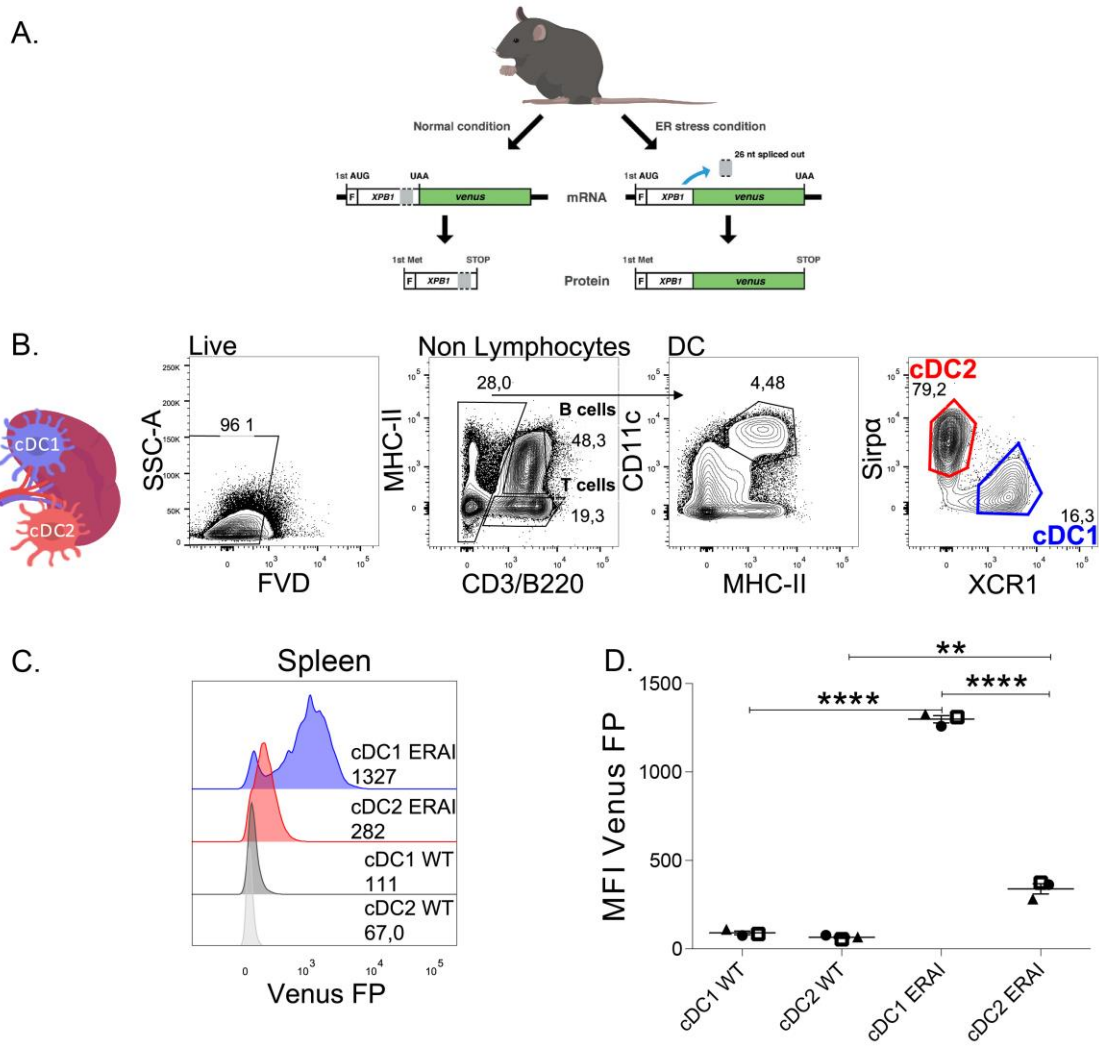


Figura 2. Validación de ratones reporteros ERAI “ER stress-activated indicator. (A) Representación explicativa de la fluorescencia de Venus-FP derivada del splicing de XBP1s en ratones ERAI. Modificado de Iwawaki et al., 2004. **(B)** Citometría de flujo y gating utilizada para la identificación de los subtipos celulares cDC1 y cDC2 en bazo. **(C)** Histogramas de la Intensidad media de fluorescencia (MFI) de Venus-FP, indicando la activación endógena del eje IRE1 α en bazo en ratones wild type e ERAI para cDC1 y cDC2. Representativo de tres experimentos independientes. **(D)** Intensidad media de fluorescencia (MFI) de Venus-FP para cada población graficada. Los datos corresponden a tres experimentos independientes con 1 ratón por condición y se muestran como promedio \pm SEM. La significancia estadística se analizó mediante un T-test no pareado con corrección Welch y con 95% de intervalo de confianza. Se muestra como: * $p < 0.05$.

Posteriormente, se analizó la activación RNasa de IRE1 α en cDC1 y cDC2 de Tumor y TdLN identificadas según la estrategia de gating de la Figura 3A y 3B elaboradas previamente en nuestro laboratorio basándose en el trabajo publicado de Broz et al., 2014 [10]. En TdLN se identificaron las cDCs migratorias de las residentes según un mayor nivel de expresión de MHC-II y un menor nivel de expresión de CD11c, y viceversa^[7]. Los subtipos migratorios fueron definidos dentro de las células vivas como Lin⁻/CD11c^{int}/MHC-II^{hi}/XCR1⁺ y Lin⁻/CD11c^{int}/MHC-II^{hi}/Sirp α ⁺; y los residentes como Lin⁻/CD11c^{hi}/MHC-II^{int}/XCR1⁺ y Lin⁻/CD11c^{hi}/MHC-II^{int}/Sirp α ⁺ para cDC1 y cDC2 como puede corroborarse en la Figura 3B y en la tabla 2. De igual manera, en tumor las poblaciones de cDC1s y cDC2s fueron definidas dentro de las células vivas como Lin⁻/CD45^{hi}/Ly6C⁻CD11b⁻/MHC-II⁺/CD24^{hi}F480⁻/XCR1⁺ y Lin⁻/CD45^{hi}/Ly6C⁻CD11b⁻/MHC-II⁺/CD24^{hi}F480⁻/Sirp α ⁺, respectivamente, tal y como se indica en la Figura 3A y en la Tabla 3. Además, en bazo y linfonodo se identificaron linfocitos B como Lin⁺/MHC-II^{hi} y linfocitos T como Lin⁺/MHC-II⁻. Cabe mencionar que las proporciones de subtipos analizados en cada tejido no varían entre los ratones tg ERAI y los ratones WT.

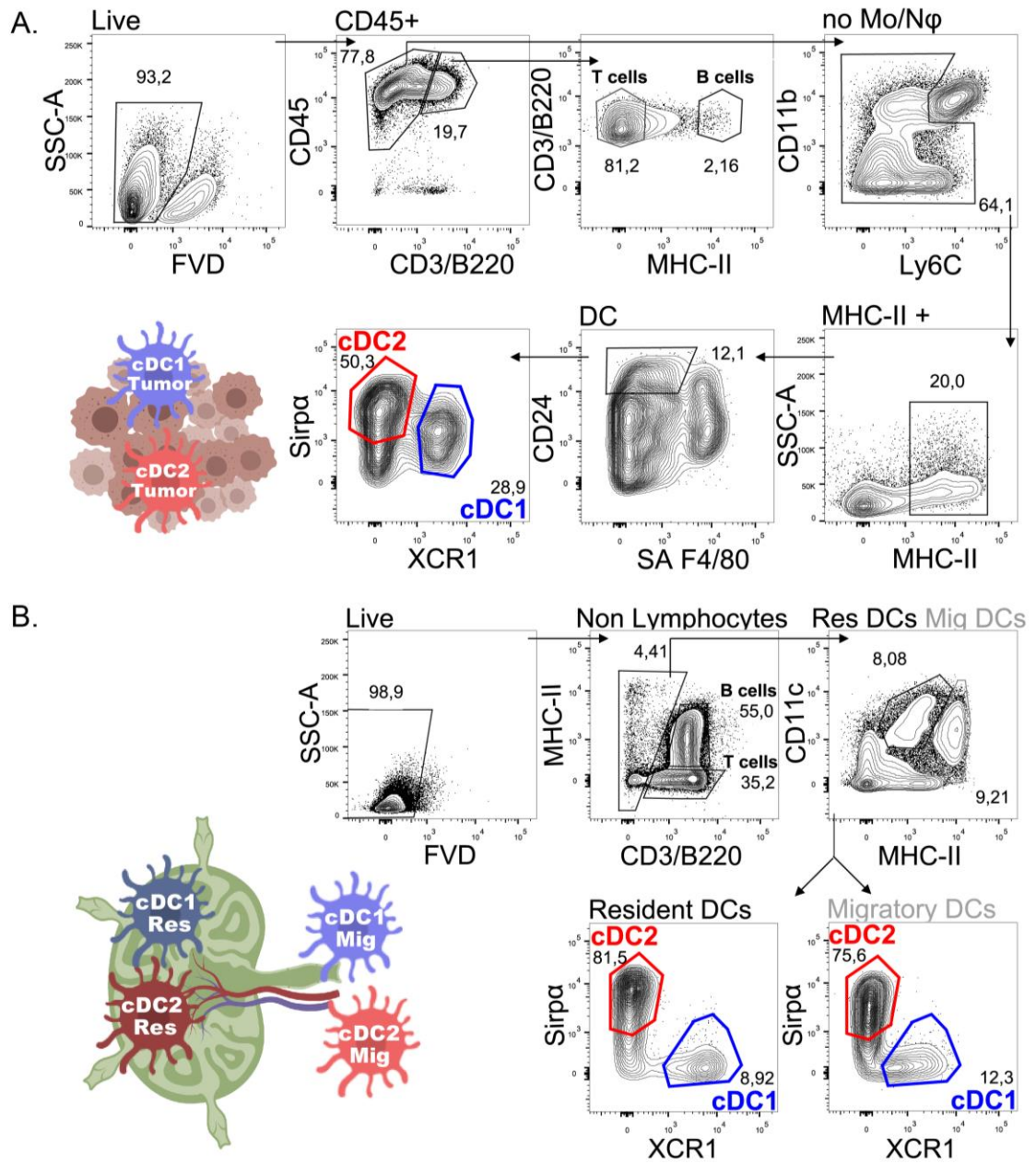


Figura 3. Poblaciones cDC1 y cDC2 de Tumor y TdLN analizadas. (A) Citometría de flujo y gating utilizada para la identificación de los subtipos celulares cDC1 y cDC2 de Tumor 16-OVA; y (B), de los subtipos celulares cDC1 y cDC2 Residentes y Migratorias en linfonodo drenante. Se usó un ratón por condición (representativo de 3 repeticiones).

Se encontró que en tumor y TdLN, al igual que en bazo, que las cDC1 poseen una mayor MFI de Venus FP que las cDC2 (Figura 4A); y que esta diferencia es significativa en tumor (Figura 4B). Asimismo, al comparar la MFI de Venus FP de cDCs de tumor versus la misma población celular que ya ha migrado al LN proveniente del tumor, se pudo apreciar que la fluorescencia de Venus FP es significativamente mayor en las cDC1 intratumorales con respecto a las cDC1 migratorias de linfonodo drenante, y levemente mayor que las cDC1 residentes de linfonodo (Figura 4C), siendo éstas últimas aquellas que nunca pasan por el tumor (Figura 1). En conjunto, esto indica que el tumor gatilla una alta activación de la vía IRE1 α en las cDC1 de tumor, la cual disminuye cuando este subtipo de DCs migra al TdLN. Este efecto del microambiente tumoral en la significativa activación de la vía se observa preferencialmente en las cDC1, pero no significativamente en las cDC2, las cuales presentan niveles de activación bastantes menores (Figuras 4A, 4B y 4C). Debe mencionarse que, tal y como era de esperar, no se observó fluorescencia de Venus FP en los controles negativos de fluorescencia correspondientes a ratones WT sin el transgén, tanto para cDC1 como para cDC2.

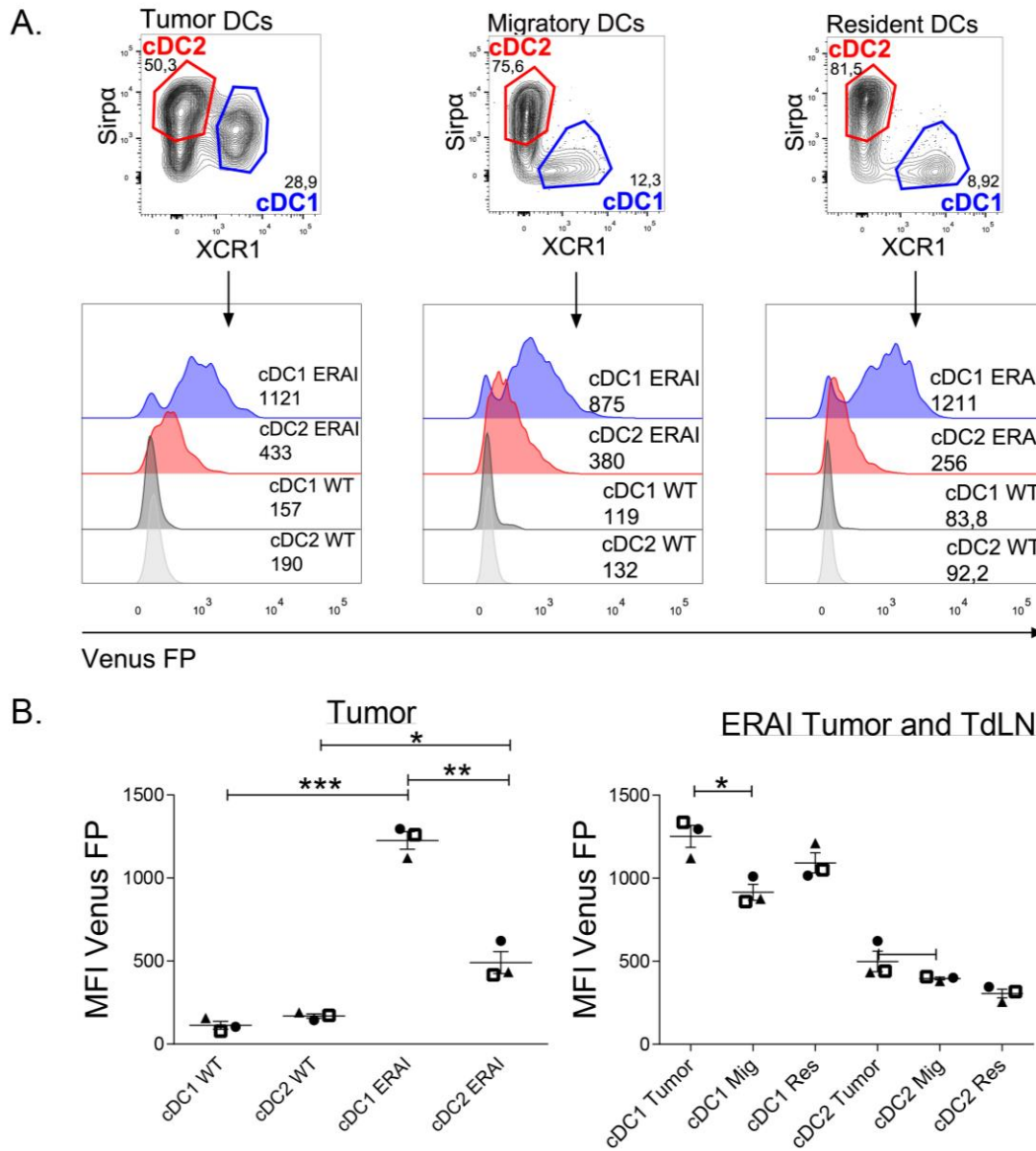


Figura 4. Activación vía IRE1 α en cDC1 y cDC2 en Tumor y TdLN. (A) Histogramas de la Intensidad media de fluorescencia (MFI) de Venus-FP, indicando la activación endógena del eje IRE1 α en tumor B16-OVA y TdLN de ratones wild type e ERAI para cDC1 y cDC2. Representativo de tres experimentos independientes. (B) Intensidad media de fluorescencia (MFI) de Venus-GFP para cada población graficada de tumor B16-OVA de ratones wild type e ERAI. (C) Intensidad media de fluorescencia (MFI) de Venus-GFP para cada población graficada de tumor B16-OVA y TdLN de ratones ERAI. Los datos corresponden a tres experimentos independientes con un ratón por condición y se muestran como promedio + SEM. La significancia estadística se analizó mediante un Welch's t-test con 95% de intervalo de confianza y se muestra como: * $p < 0.01$.

2. Determinar si activación de la vía IRE1 α induce la inmunogenicidad y la activación canónica de genes de la UPR en DCs tumorales y de nodos linfáticos. Con respecto al segundo objetivo, en una primera etapa, se observó la activación de DCs mediante el análisis de la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86, PDL1, según su MFI, la cual fue relacionada con el grado de activación de la vía IRE1 α en estas células (Figura 5A y 5B). En la Figura 5A se puede apreciar que, si bien hay una clara activación de la vía IRE1 α -XBP-1s en las cDC1 con respecto a las cDC2, tal y como ya se había mencionado, ésta aparentemente no se relaciona con una mayor o menor activación de marcadores de superficie asociados a activación de células dendríticas. Lo cual coincide con lo previamente reportado en nuestro laboratorio, en donde se observó que el tratamiento con el inhibidor de la actividad RNasa de IRE1 α , 4 μ 8C, no afectó la expresión de CD80, CD86 o PD-L1 en DCs derivadas de médula ósea de ratones ERAI, cultivadas con Flt3L (FL-DCs) y activadas con lisados de melanoma (Medel y Costoya, aceptado).

Al analizar el grado de expresión de los marcadores de superficie estudiados (Figura 5B) se observó que en cDC1 intratumorales cerca del 50% de la población que expresa altos niveles de CD80, un 34% expresa altos niveles de PD-L1 y sólo un 10% expresa altos niveles de CD86. Mientras que en cDC2 intratumorales se observó algo similar, aunque el porcentaje de la población que expresó CD80 y PD-L1 fue un poco mayor en comparación a las cDC1; 63% y 46% respectivamente. En ambos casos se utilizó el grado de expresión de estos marcadores en linfocitos T como control negativo de activación.

Cabe destacar que, el grado de activación de CD80 es mucho mayor que el de CD86 en ambos subtipos, y si bien se sabe que ambas moléculas proveen una coestimulación eficiente mediante CD28 en linfocitos T; su patrón de expresión difiere en una misma célula, y en general se ha visto que CD86 es expresado de una manera más amplia y en mayores niveles que CD80. En esta línea, existe evidencia de que las DCs se encuentran en constante control de los linfocitos T reguladores pudiendo exacerbar o suprimir la respuesta inmune ^[75], gracias a la modulación de la expresión relativa de CD86 y CD80 en DCs activadas que poseen roles opuestos ^[75]. De esta manera, la ausencia (o bajos niveles) de CD86 podrían contribuir a la tolerancia periférica^[2, 75], lo cual podría ser una razón de los bajos niveles de CD86 observados en las cDCs de tumor (Figura 5B).

En conclusión, la activación de la vía IRE1 α -XBP-1s no se relaciona con una mayor o menor activación de CD80, CD86 o PD-L1 en células dendríticas tumorales o de TdLN.

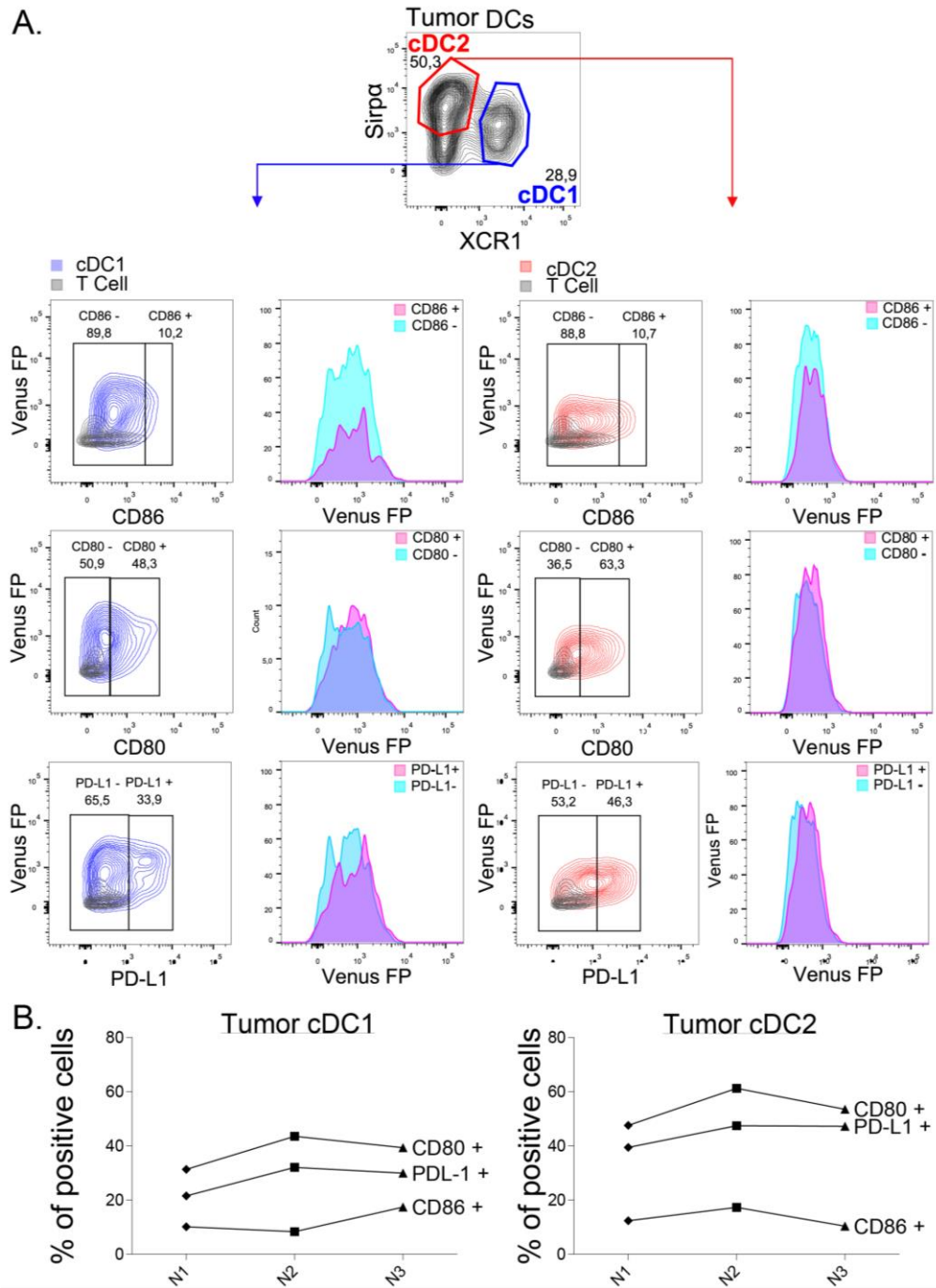


Figura 5. Relación de la activación de la vía IRE1 α y la Inducción inmunogenicidad en cDC1 de Tumor. (A) Relación entre la Intensidad media de fluorescencia (MFI) de Venus-FP para cDC1 (azul) y cDC2 (rojo) de tumor B16-OVA de ratones ERAI; y el grado de activación de marcadores de superficie CD80, CD86 y PD-L1, junto a los histogramas de la fluorescencia de Venus-FP para las poblaciones positivas y negativas de cada marcador. Representativo de 3 experimentos independientes con 1 ratón por condición. **(B)** Porcentaje de células positivas para cada marcador dentro del total de cDC1 y cDC2.

En una segunda etapa, se observó si la activación del eje IRE1 α era capaz de inducir la expresión de genes blanco de XBP1 y de RIDD en cDCs sorteadas de tumor y TdLN. Para ello, fue necesario desarrollar una estrategia para poder expandir el número de DCs infiltrantes de tumor, para lograr sortear una mayor cantidad de éstas y contar así con los requerimientos mínimos para obtener cantidades suficientes de mRNA y poder realizar los experimentos de qPCR eficientemente. Esto debido a que en una primera aproximación, empleando la línea B16-OVA para la inoculación de los tumores en ratones, se logra aislar un número muy bajo de cDCs intratumorales como para lograr un buen rendimiento (2 mil-3 x10³ cDC1 por tumor versus 8 mil-12 mil, 500-800 cDC2 por tumor versus 1,5 mil -3 x10³). En base a reportes previos, se ha observado que la inyección intraperitoneal de la citoquina Flt3L es altamente eficiente en expandir la población de cDC1s en ratones con tumor B16^[11]. Siguiendo esta estrategia experimental, se empleó para la inoculación de los tumores la línea murina de melanoma B16 transfectada con el gen de la citoquina Flt3L (ligando de Flt3) ^[66], la cual promueve la proliferación y supervivencia de las DCs en los tejidos. Con este método, se logró una importante expansión de las poblaciones cDC1 y cDC2 de tumor y linfonodo de ratones inoculados con la línea B16-Flt3L (Figuras 6B y 7B), con respecto a aquellas de ratones inoculados con la línea B16-OVA (Figuras 6A y 7A), de acuerdo a lo reportado en la literatura ^[11, 65, 66].

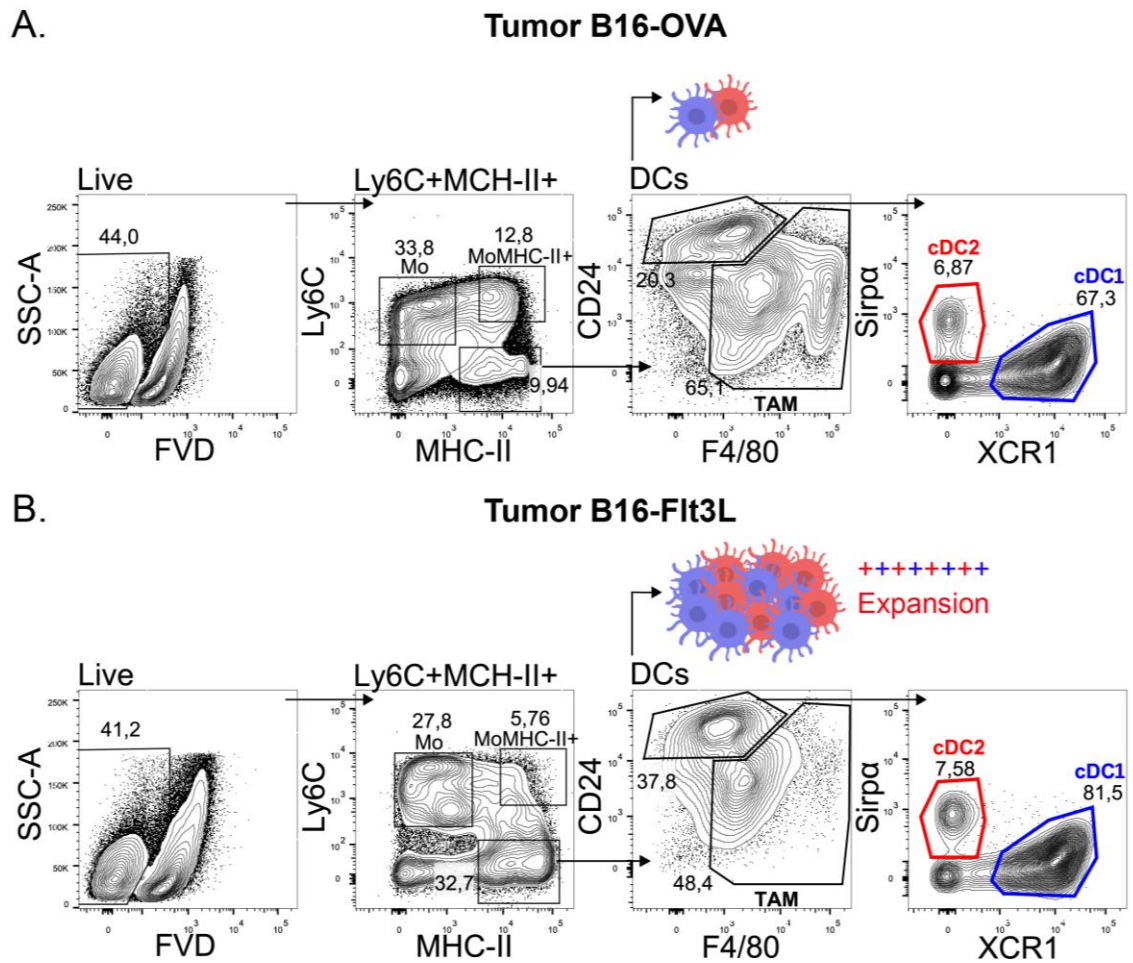


Figura 6. Poblaciones cDC1 y cDC2 de Tumor analizadas. (A) Representación explicativa de la ubicación de las poblaciones celulares sorteadas. Citometría de flujo y gating utilizada para la identificación de los subtipos celulares cDC1 y cDC2 de (B) tumor B16-OVA y de (C) tumor B16-Flt3L.

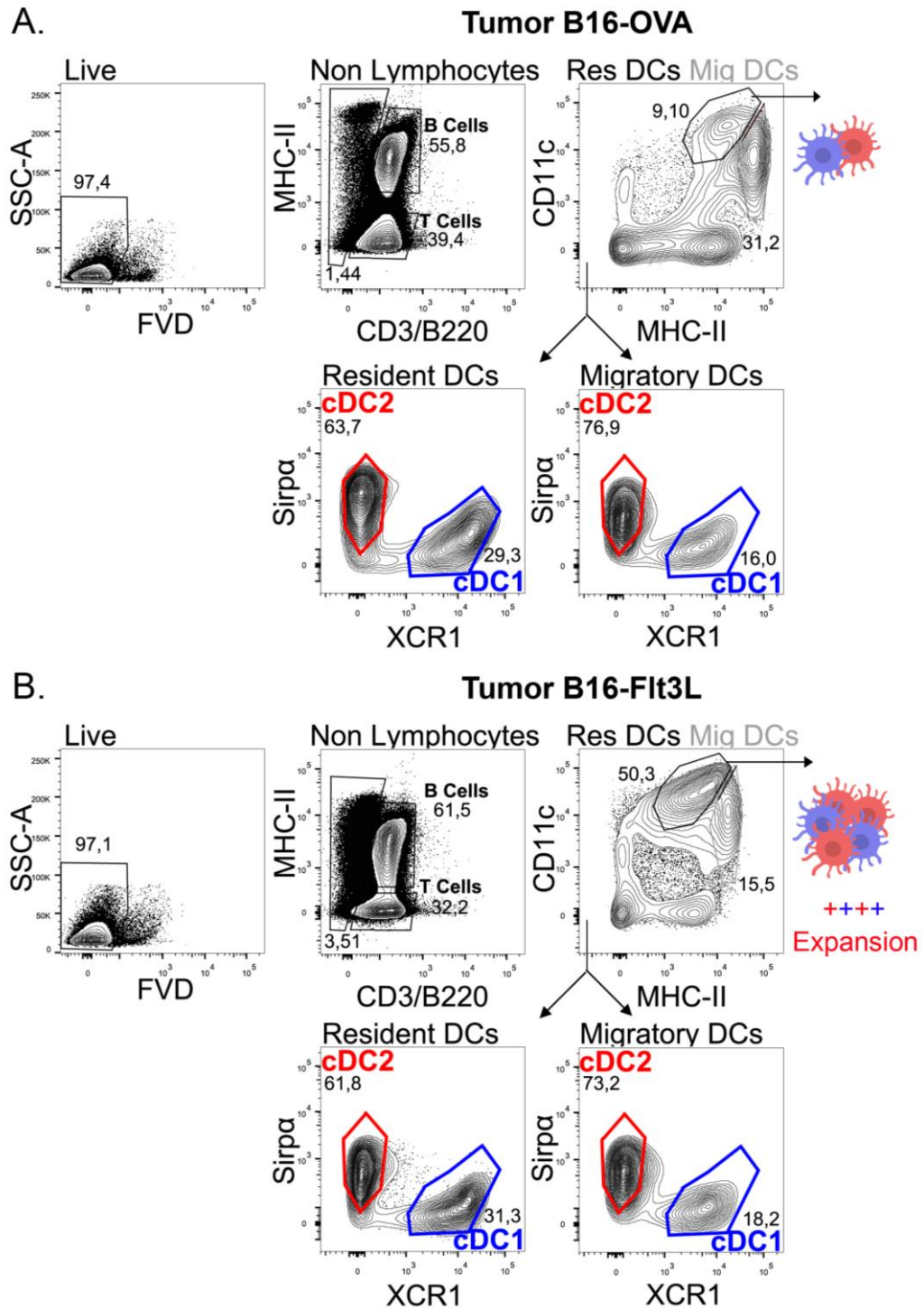


Figura 7. Poblaciones cDC1 y cDC2 de TdLN analizadas. (A) Citometría de flujo y gating utilizada para la identificación de los subtipos celulares cDC1 y cDC2 residentes y migratorias de linfonodo drenante de tumor B16-OVA; y (B) de linfonodo drenante de tumor B16-Flt3L. Se utilizó un ratón por condición.

Al cuantificar ésta expansión, gracias al uso de esferas magnéticas anti-CD45, se vió un aumento del total de DCs intratumorales desde un 2,02% a un 12,35% dentro de las células vivas CD45⁺, y que la proporción entre los subtipos cDC1 y cDC2 se mantiene (Figura 8A). También puede apreciarse una expansión de la población de DCs residentes de TdLN principalmente (Figura suplementaria 5) y su cuantificación indica una expansión de la población de DCs residentes de TdLn de un 0,13% a un 1,77% y de la población de DCs migratorias de TdLN de un 0,45% a un 0,74% dentro de las células vivas. Finalmente al graficar la relación de las poblaciones indicadas de tumor B16-Flt3L con respecto al tumor B16-OVA (Figura 8B), y también para TdLN (Figura 8C), se hace más notoria la expansión al comparar con otras poblaciones celulares presentes. Es importante resaltar que para este objetivo las gates varían un poco con respecto a las anteriores en tumor, ya que el equipo empleado para sortear sólo dispone de 8 canales por lo cual fue necesario prescindir de algunos marcadores como CD11b, CD3 y B220. De esta manera las poblaciones de cDC1s y cDC2s de tumor fueron definidas dentro de las células vivas como CD45^{hi}/Ly6C⁻MHC-II⁺/CD24^{hi}F480⁻/XCR1⁺ y CD45^{hi}/Ly6C⁻MHC-II⁺/CD24^{hi}F480⁻/Sirp α . Se definieron también en tumor los monocitos como CD45^{hi}/Ly6C⁺MHC-II⁻, monocitos presentadores (moMHC-II) como CD45^{hi}/Ly6C⁺MHC-II⁺, y macrófagos asociados a tumor (TAM) como CD45^{hi}/Ly6C⁻MHC-II⁺/CD24^{lo}F480⁺.

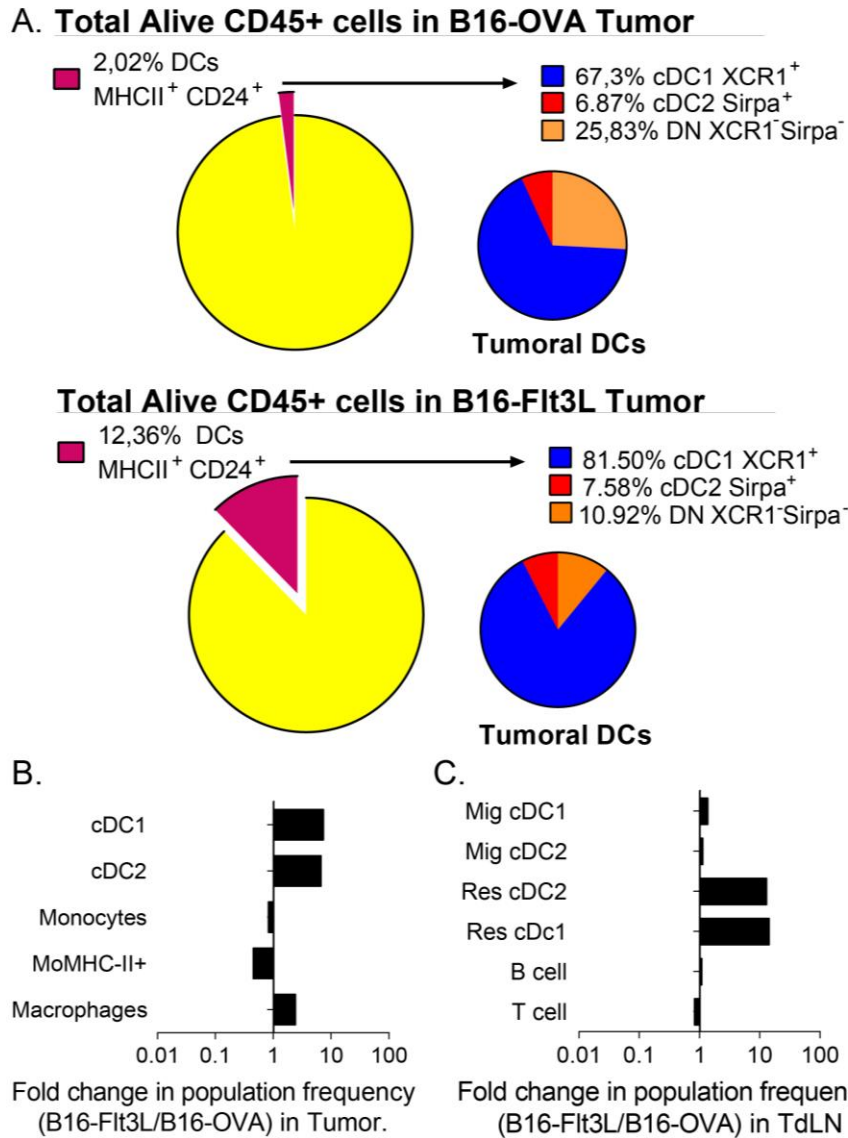


Figura 8. Expansión poblaciones de cDCs en Tumor B16-Flt3l y TdLN. (A) Comparación del porcentaje de células dendríticas convencionales MHC-II+CD24+ dentro de la población de células vivas CD45+ de tumor B16-OVA y de tumor B16-Flt3l. Además, se indica el porcentaje de cada subtipo de cDC dentro del total de éstas. (B) Relación de las poblaciones indicadas de tumor B16-Flt3 con respecto al tumor B16-OVA, y (C) de linfonodo drenante de tumor B16-Flt3l con respecto a linfonodo drenante de tumor B16-OVA.

La versión 10.4 del software Flow Jo, utilizado para todos los análisis de citometría, permite analizar muestras distintas en un mismo gráfico y seleccionar la misma cantidad de células para cada muestra de manera que esta comparación sea correcta. Utilizando esta herramienta se puede ver en la figura 9A la comparación de las poblaciones de células vivas CD45+ de los tumores B16-Flt3L (izquierda de cada gráfico) y B16-OVA (derecha de cada gráfico), y la expresión de cada uno de los marcadores de superficie empleados. Los plots corresponden a un total de 100 mil células (50 mil de cada tumor) vivas CD45+. Pueden apreciarse, aún más claramente que en la figura 6, la diferencia entre la expresión de marcadores de superficie para cada tumor. Por ejemplo, se observa cómo en el tumor B16-Flt3L aumentan las células positivas para MHC-II, CD24 y XCR1 (cDC1), aumentando desde un 2,57% a un 13,1% la población positiva para XCR1 en el tumor B16-Flt3L. De la misma forma, se corrobora esta expansión con el *tSNE* de la figura 9B, que también fue hecho sobre 50 mil células vivas CD45+ de cada tumor. Con este análisis se aprecia según los *heatmaps* obtenidos, que los *gates* positivos para dichos marcadores son más densos ya que poseen mayor cantidad de células.

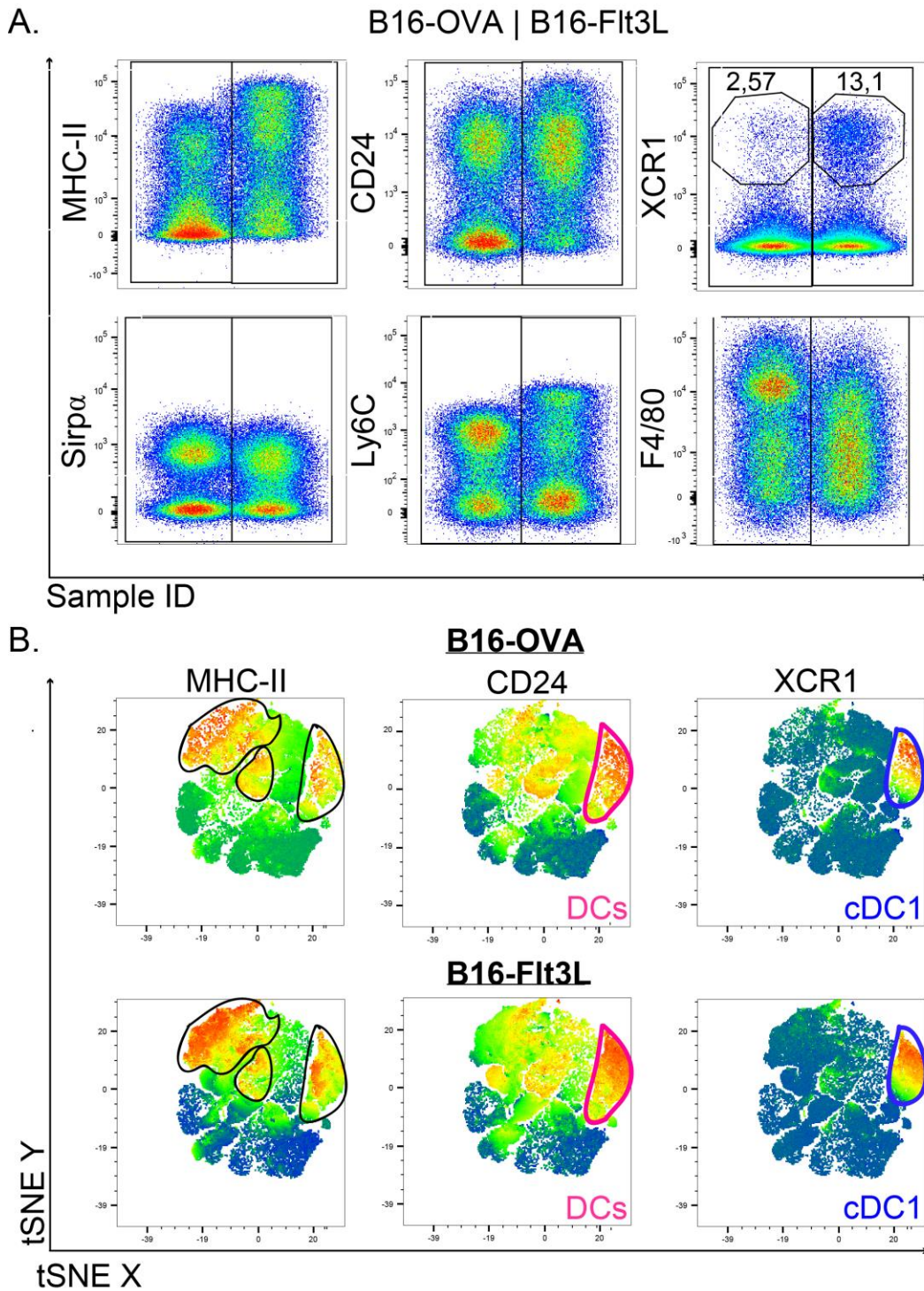


Figura 9. Expansión poblaciones de cDCs en Tumor B16-Flt3L. (A) Comparación de las poblaciones de células vivas CD45+ de tumor B16-OVA y de tumor B16-Flt3L para cada marcador analizado (B) tSNE de las poblaciones vivas CD45+ de tumor B16-OVA y tumor B16-Flt3L.

Luego de sortear las poblaciones deseadas, la identidad de los subtipos adquiridos fue verificada según los marcadores de linaje asociados a cDCs, en células sorteadas de TdLN (Figura 10B); para así, debido a la escasez de ARN obtenido a pesar de la expansión celular lograda, privilegiar el uso del cDNA de cDCs tumorales en la cuantificación de los genes blanco de XBP-1s y RIDD. Se determinó la expresión de genes asociados a linaje de DCs relativa a L27 como housekeeping, ya que este gen ha demostrado mantener una expresión estable frente a diferentes tipos celulares y condiciones experimentales^[76], y se concluyó que las poblaciones sorteadas correspondían a las esperadas ya que sólo los subtipos cDC1 de TdLN residentes y migratorios expresaron el gen *Irf8*^[7, 72] en conjunto a una mayor expresión de *Batf3*^[7, 72] y *Id2*^[7, 72] característicos de este linaje^[9]; y sólo los subtipos cDC2 expresaron altos niveles del gen *Irf4*^[7, 73] en conjunto a una menor expresión de *Batf3*^[7, 72] y *Id2*^[7, 72], como se ha reportado^[9]. Además, tanto cDC1s como cDC2s expresaron el gen *Zbtb46*^[7, 74] que normalmente es altamente expresado en células dendríticas convencionales. Habría sido importante incluir una población que no expresara *Zbtb46* como control negativo, sin embargo, por limitaciones de tiempo en la cantidad de poblaciones sorteadas este control no fue incluido (el equipo permite sortear 4 poblaciones a la vez). De esta manera, en base la expresión diferencial de factores de transcripción y factores de crecimiento que definen a cada subtipo fue posible validar la correcta identificación de cDC1s y cDC2s.

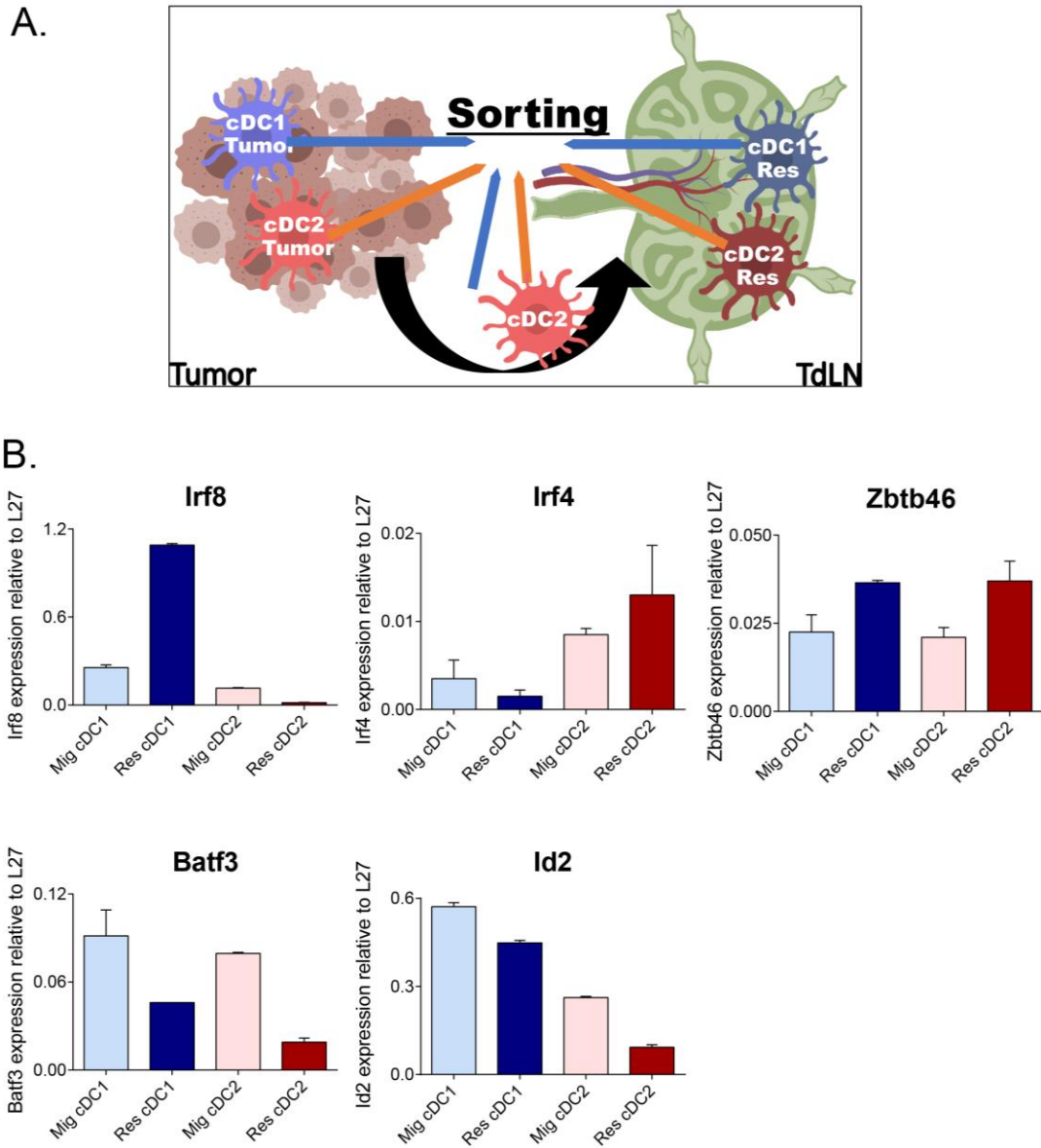


Figura 10. Expresión de genes de linaje de cDC1 y cDC2 residentes y migratorias de TdLN sorteadas. (A) Expresión de los genes indicados asociados al linaje de cDC1 y cDC2, relativa a la expresión de L27 como housekeeping cuantificada mediante qPCR. Los datos corresponden a un experimento en duplicado de un pool de 5 ratones y se muestran como promedio \pm SEM.

Una vez lograda la expansión y validación de los subtipos celulares estudiados, se cuantificó por qPCR la expresión de *Xbp-1s* (Figura 11A) para corroborar la activación del eje IRE1 α observado previamente. Esta expresión fue significativamente mayor en las cDC1 de tumor con respecto a las cDC1 migratorias de TdLN. Esto último también se aprecia con las cDC2 de TdLN de manera significativa. Se cuantificó, además, la expresión de los genes blanco de *Xbp-1s*, *Erp44* y *Edem1*, pero no fue posible ver una mayor expresión de los genes blanco a pesar de los altos niveles de *Xbp-1s* observados en las cDC1 de tumor (Figura 11A). En vista a estos resultados, se cuantificaron los genes blanco de RIDD *Bloc1s1*, *Tapbp* y *Ergic3*, para determinar si existía una activación de esta vía en las poblaciones analizadas (Figura 11B). *Bloc1s1* demostró ser significativamente menor en las cDC1 de tumor en comparación a las cDC1 migratorias de TdLN sugiriendo que RIDD estaría activando células infiltrantes del tumor. Las cDCs residentes de los LNs expresan bajos niveles de los transcritos sin embargo no pueden ser directamente comparadas con las DCs migratorias o infiltrantes de tumor ya que como se explicó en la introducción, este linaje celular llega al LN directamente desde el torrente sanguíneo sin nunca pasar por el tumor. Para el caso de *Tapbp* se observaron las mismas tendencias que para *Bloc1s1*: las cDC1 intratumorales expresan menores niveles del transcrito que las cDC1 migratorias que han migrado al LN desde el tumor. No fue posible observar una tendencia clara con el tercer blanco de RIDD *Ergic3*. Para todos los genes se muestra un control negativo y un control positivo de estrés de RE, los cuales corresponden a DCs generadas *in vitro* con GMSCF sin tratamiento o tratadas con Tunicamicina 1 μ g/ml por 8

horas. En efecto, se observó una mayor la degradación de los genes blanco de RIDD *Bloc1s1* y *Tapbp* que disminuyen su expresión en cDC1s de tumor en comparación a las migratorias de TdLN (Figura 10B), pero no una mayor expresión de los genes blancos de *Xbp-1s* a pesar de los altos niveles de *Xbp-1s* observados, lo cual indica una preferencia por RIDD de las cDC1 en el contexto de melanoma B16. Es importante destacar que los datos de qPCR obtenidos para las cDC2 de tumor no fueron incluidos debido a que se encontraron por debajo del rango de confianza de medición de la técnica.

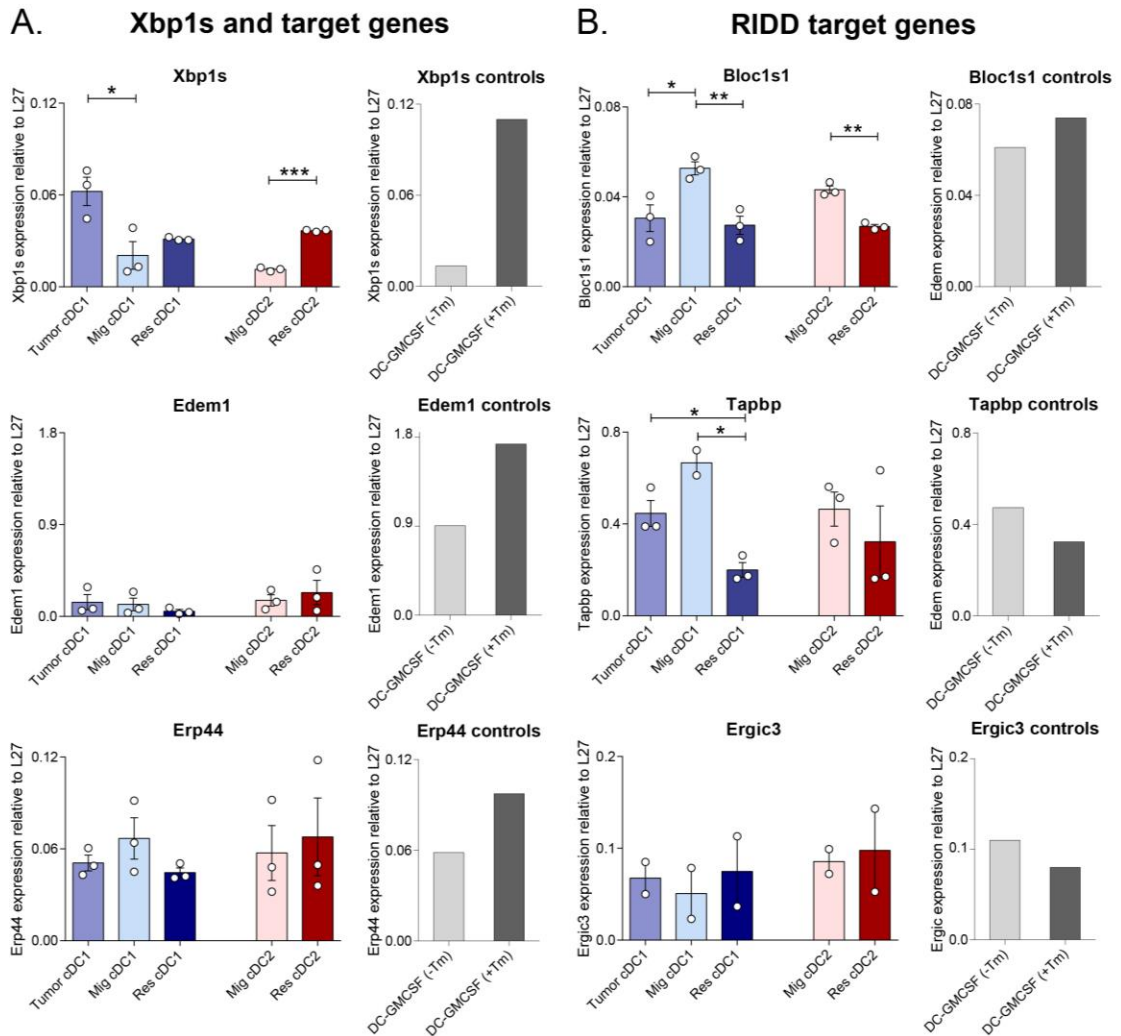


Figura 11. Expresión de genes asociados a UPR y RIDD en cDC1 y cDC2 sorteadas de Tumor B16-Flt3 y TdLNs. (A) Expresión de Xbp1s y dos de sus genes blanco; y (B) expresión de genes blanco de RIDD en las poblaciones indicadas cuantificada mediante qPCR. La expresión de todos los genes se muestra con relación a la expresión de L27 como housekeeping. Los datos corresponden a tres experimentos independientes de un pool de 5 ratones cada uno, y se muestran como promedio \pm SEM.

*Los datos de cDC2 de tumor no fueron incluidos por encontrarse fuera del rango de confianza de la medición.

Finalmente, se corroboró por PCR convencional el splicing de *Xbp-1* como se aprecia en la Figura 12A y 12B, donde se observa un elevado splicing en las cDC1 de tumor y en ambos subtipos residentes de TdLN, el cual es mayor respecto al observado en las cDC1 migratorias, confirmando los datos obtenidos en el ratón reportero ERAI. Esto también fue observado previamente mediante qPCR. La misma tendencia se observa para las cDC2, aunque no pudo ser corroborado por qPCR en las cDC2 de tumor. Sumado a lo anterior, se reportó una tercera banda inespecífica distinta a la de *Xbp-1* spliced y a de *Xbp-1* unspliced ubicada sobre ésta última. Se observa, además, que todas las poblaciones analizadas presentan un alto grado de splicing de *Xbp1-s* en comparación al control negativo sin tratar, indicando ER estrés en todas ellas. Sumada a la presencia de *Xbp-1s*, los niveles de *Xbp-1u* detectados son también un indicador de estrés de RE ya que, en mamíferos, *Xbp-1u* es muy inestable y su proteína es degradada por el proteosoma siendo en general indetectable en células normales^[27], tal y como puede corroborarse con el control negativo sin tratar de la Figura 11A.

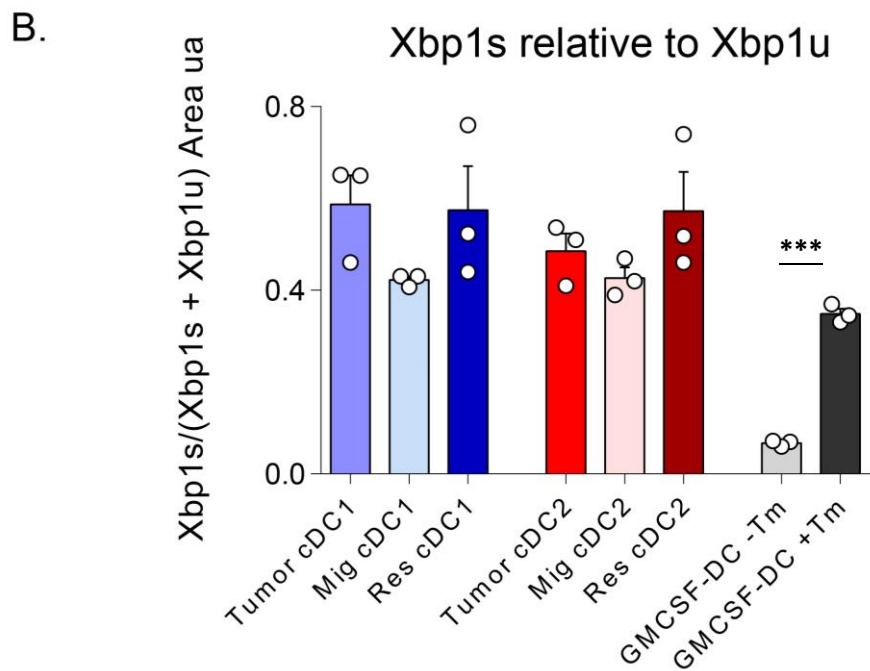
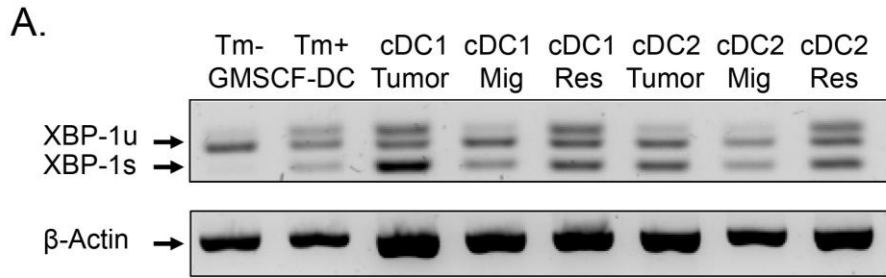


Figura 12. Activación eje IRE1 α /Xbp1s según splicing de Xbp1 en cDCs sorteadas de tumor y TdLN. (A) Splicing de Xbp1 en los subtipos celulares cDC1 y cDC2 de Tumor B16-Flt3l y de TdLN Residentes y Migratorias. Se indican las bandas obtenidas para Xbp1 unspliced, Xbp1 spliced y β -Actina como housekeeping. Los datos corresponden a cDNA de tres experimentos independientes obtenidos a partir de un pool de 5 ratones cada uno. **(B)** Relación de Xbp1 spliced y unspliced para cada población indicada, cuantificada a partir de **A** mediante el uso del software Image J y mostrado como promedio \pm SEM.

DISCUSIÓN

Altos niveles de splicing de XBP-1 fueron observados en las cDC1 de tumor en comparación al mismo linaje celular que ha migrado desde el tumor al linfonodo drenante, lo cual pudo ser apreciado por la intensidad de fluorescencia de Venus FP en ratones ERAI (Figura 3), por qPCR (Figura 10A) y por PCR (Figura 11). Esta elevada actividad RNasa de IRE1 α ya ha sido previamente reportada en nuestro laboratorio, en DCs derivadas de médula ósea, cultivadas con Flt3L (FL-DCs) y activadas con lisados de melanoma (Medel y Costoya, aceptado). Sin embargo, se desconocía la influencia del nicho tumoral en la inducción de este eje en DCs. A pesar de los altos niveles de XBP-1s y *Xbp-1s* detectados, no se observó una mayor expresión de sus genes blanco en cDC1 de tumor (Figura 10A), pero sí una menor expresión de los genes blanco de RIDD *Bloc1s1* y *Tapbp* (Figura 10B), sugiriendo una posible degradación de estos sustratos por parte de IRE1 α . Estos datos potencian la idea de una preferencia por RIDD en estas células en el contexto de melanoma estudiado y que el programa transcripcional mediado por XBP1s no es evidente en este tipo celular.

Además, se observaron bajos niveles de CD86 y altos niveles de CD80 y PD-L1 en las cDCs tumorales (1 y 2), lo cual se ha relacionado con un fenotipo capaz de activar linfocitos Treg^[75]. Esto no fue observado en las cDCs de migratorias de TdLN que mostraron altos niveles de CD86 (Figura suplementaria 2). Si bien esto se contradice con la información previa de que las cDC1 son capaces de mantener sus propiedades

inmunogénicas dentro del nicho tumoral, la hiperactivación de IRE1 α podría explicar estas diferencias y sería muy interesante estudiar en mayor detalle los efectos del proceso de RIDD en este subtipo celular a nivel funcional. De hecho, se ha observado que en DCs deficientes de XBP-1 se ve afectado el fenotipo y la capacidad de presentar antígenos de CD8 α^+ cDCs en condiciones no inflamatorias ^[26]. Resultados preliminares indican que las cDC1 de TdLN de tumor B16-OVA de ratones ERAI liberan mayor cantidad de IL-12 que las cDC2, y que esta cantidad es levemente mayor en las DCs migratorias con respecto a las residentes (Figura suplementaria 4), sugiriendo que su función no se vio afectada o que al menos es restaurada al llegar al linfonodo. Es necesario repetir este experimento y ver qué ocurre dentro del tumor. Sería interesante comprobar esta idea con ensayos in vitro de presentación cruzada de cDC1s provenientes de tumor. En resultados previos de nuestro laboratorio, hemos visto que la pérdida de la función RNasa de IRE1 α convierte a las DCs derivadas de médula ósea en pobres estimuladores de CTLs al ser activadas con lisados de melanoma (Medel y Costoya, aceptado), lo cual podría deberse a una pérdida de RIDD más que de XBP-1s.

Estudios en cDC2 ^[53] y en linfocitos T ^[63] en el modelo de cáncer ovárico, han demostrado que el microambiente tumoral favorece la activación de IRE1 α -XBP-1s y no de RIDD en ambas células inmunes. La delección de XBP-1s y de IRE1 α restaura la función inmunogénica de estas células, lo que valida que es esta activación de IRE1 α -XBP1s y no de RIDD ni tampoco la actividad quinasa de IRE1 α , la responsable de esta pérdida de función en el contexto tumoral. Como ya se ha mencionado, en las cDC1 existe una

activación endógena de IRE1 α -XBP-1s, y por ende altos niveles de XBP-1s ^[26]; los cuales fueron aún más elevados en las cDC1 de tumor según los resultados de este trabajo. Esto fue corroborado por la señal ERAI, el splicing de XBP-1s y por la expresión de su ARNm, sugiriendo un efecto del tumor sobre la actividad endonucleasa de IRE1 α que afecta de diferente manera a las cDC1. Probablemente, esto se deba a que esta actividad ya es alta basalmente, y que, por ello, con este estímulo extra por parte del tumor se promueva la hiperactivación de IRE1 α en lugar de IRE1 α -XBP1s, y con ello la activación de RIDD. Interesantemente, se ha visto que en ratones con delección selectiva de XBP-1 en cDC1s existe una pérdida celular intrínseca de este subtipo en pulmón causada por apoptosis, pero no en mucosa intestinal. Mediante el uso de ratones con delección selectiva de tanto XBP-1 como de IRE1 α , esta sobrevida de las cDC1 de mucosa intestinal fue asociada a una pronunciada activación de RIDD, y, asimismo se observó que la pérdida de RIDD por sobre la de XBP-1 causó la muerte celular de cDC1s de pulmón. En base a dichos resultados los autores concluyeron que la actividad endonucleasa de IRE1 α establece el umbral para la sobrevida de cDC1 frente al estrés de RE ^[44]. En base a este trabajo, la preferencia selectiva por RIDD observada en este subtipo celular bajo los efectos del tumor podría ser clave en explicar la capacidad de estas células de mantener sus propiedades inmunogénicas dentro del nicho tumoral, a diferencia de otras células inmunes que pierden su función bajo el mismo contexto.

En resumen, (Figura 12)

1. El microambiente tumoral favorece significativamente la activación de la vía IRE1 α en las cDC1, y en menor medida en las cDC2.
2. La expresión de moléculas coestimuladoras no se relaciona con una activación de la vía IRE1 α /XBP1-s dentro de una misma población de cDCs; sin embargo, las cDC1 que son el subtipo con mayor activación de IRE1 α mostraron menores niveles de PD-L1 y CD80 con respecto a las cDC2.
3. Debido a la disminuida expresión de algunos ARNm sustratos de IRE1 α en cDC1s infiltrantes del nicho tumoral, se sugiere que estas células presentarían una sobreactivación de la actividad RNasa de IRE1 α indicativa de RIDD.

Nuevas perspectivas serían de gran ayuda en definir un análisis detallado de las moléculas y vías que son capaces de modular el desempeño de las cDCs durante el desafío tumoral. En esta línea, la preferencia por RIDD por sobre la vía IRE1 α /XBP-1s en cDC1s tumorales pareciera modular su respuesta inmune de manera diferencial con respecto a otras células inmunes, lo cual debe ser validado con ensayos funcionales de este subtipo. Actualmente se pretende observar si esta preferencia por RIDD en cDC1s de tumor es citoprotectora o citotóxica, mediante el análisis de la expresión de Klf9 en estas células.

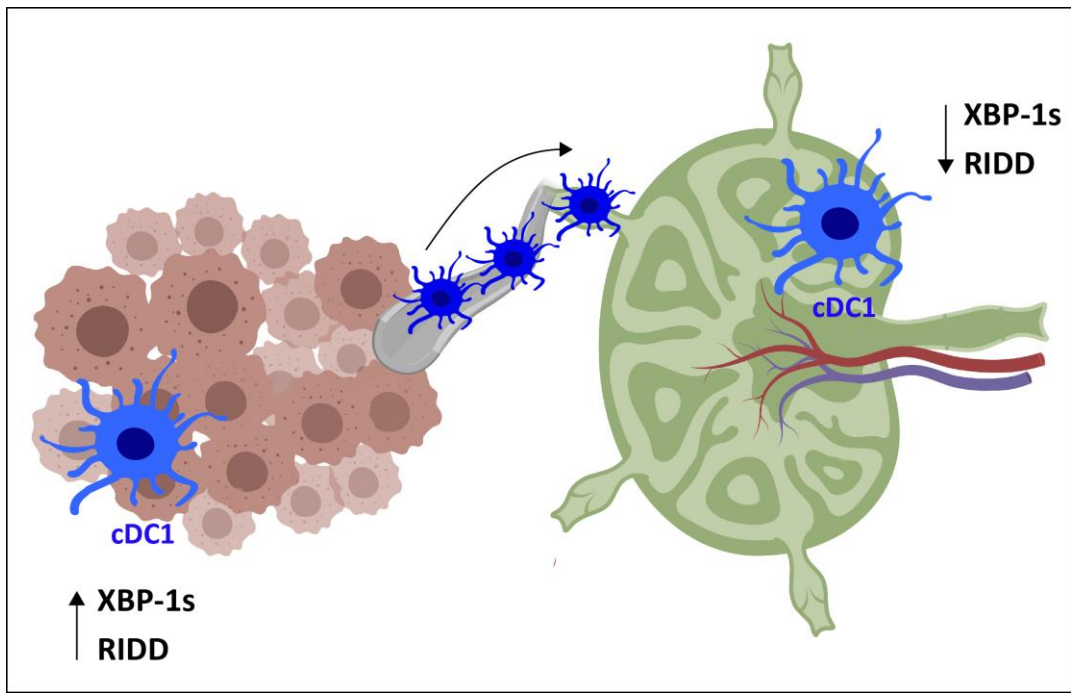


Figura 13. Modelo propuesto: Mayor splicing de XBP-1 y mayor activación de RIDD en cDC1 intratumorales y su disminución tras migrar a TdLN.

RECURSOS MATERIALES Y FINANCIAMIENTO

Esta tesis se realizó bajo el marco del Programa disciplinario de inmunología en el laboratorio de Inmunología y estrés celular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, junto al laboratorio de Regulación de la respuesta inmune del cáncer y al laboratorio de Inmunología del cáncer, de la misma facultad, y al laboratorio de Inmunología de la facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Estos laboratorios cuentan con todos los equipos y materiales requeridos para esta tesis. Este trabajo de tesis fue financiado por los proyectos Fondecyt 1161212 y HHMI 55008744 de la doctora Fabiola Osorio y la Beca de Magíster Nacional CONICYT-PFCHA/Magíster Nacional/2017- 22171230 de Sandra Gaete.

REFERENCIAS

1. Iwawaki, T., et al., *A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress*. Nat Med, 2004. **10**(1): p. 98-102.
2. Mildner, A. and S. Jung, *Development and Function of Dendritic Cell Subsets*. Immunity. **40**(5): p. 642-656.
3. Hart, D.N., *Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response*. Blood, 1997. **90**(9): p. 3245-3287.
4. Durai, V. and Kenneth M. Murphy, *Functions of Murine Dendritic Cells*. Immunity. **45**(4): p. 719-736.
5. Theisen, D. and K. Murphy, *The role of cDC1s in vivo: CD8 T cell priming through cross-presentation [version 1; referees: 3 approved]*. F1000Research, 2017. **6**(98).
6. Schraml, B.U. and C. Reis e Sousa, *Defining dendritic cells*. Current Opinion in Immunology, 2015. **32**: p. 13-20.
7. Merad, M., et al., *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**: p. 563-604.
8. Guillemins, M., et al., *Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny*. Nature reviews. Immunology, 2014. **14**(8): p. 571-578.
9. Guillemins, M., et al., *Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species*. Immunity, 2016. **45**(3): p. 669-684.
10. Broz, M.L., et al., *Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen-presenting cells critical for T cell immunity*. Cancer Cell, 2014. **26**(5): p. 638-52.
11. Salmon, H., 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): p. 924-38.
12. Waskow, C., et al., *The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues*. Nat Immunol, 2008. **9**(6): p. 676-83.
13. Edelson, B.T., et al., *Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells*. J Exp Med, 2010. **207**(4): p. 823-36.
14. Schiavoni, G., et al., *ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-producing cells and for the generation and activation of CD8alpha(+) dendritic cells*. J Exp Med, 2002. **196**(11): p. 1415-25.
15. Hildner, K., et al., *Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8alpha(+) Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity*. Science (New York, N.Y.), 2008. **322**(5904): p. 1097-1100.
16. Hacker, C., et al., *Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 380-6.
17. Tussiwand, R., et al., *Klf4 expression in conventional dendritic cells is required for*

- T helper 2 cell responses*. *Immunity*, 2015. **42**(5): p. 916-28.
18. Schlitzer, A., et al., *IRF4 transcription factor-dependent CD11b+ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses*. *Immunity*, 2013. **38**(5): p. 970-83.
 19. Lewis, K.L., et al., *Notch2 receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine*. *Immunity*, 2011. **35**(5): p. 780-91.
 20. Scott, C.L., et al., *The transcription factor Zeb2 regulates development of conventional and plasmacytoid DCs by repressing Id2*. *J Exp Med*, 2016. **213**(6): p. 897-911.
 21. Cruz, F.M., et al., *The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules*. *Annu Rev Immunol*, 2017. **35**: p. 149-176.
 22. López, M., et al., *Avances en inmunoterapia celular contra el melanoma maligno*. *Revista médica de Chile*, 2004. **132**: p. 1115-1126.
 23. Allan, R.S., et al., *Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells*. *Science*, 2003. **301**(5641): p. 1925-8.
 24. Grootjans, J., et al., *The unfolded protein response in immunity and inflammation*. *Nature reviews. Immunology*, 2016. **16**(8): p. 469-484.
 25. Oakes, S.A. and F.R. Papa, *The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology*. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2015. **10**(1): p. 173-194.
 26. Osorio, F., et al., *The unfolded-protein-response sensor IRE-1alpha regulates the function of CD8alpha+ dendritic cells*. *Nat Immunol*, 2014. **15**(3): p. 248-57.
 27. Hetz, C., et al., *The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1alpha*. *Physiol Rev*, 2011. **91**(4): p. 1219-43.
 28. Walter, P. and D. Ron, *The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation*. *Science*, 2011. **334**(6059): p. 1081-6.
 29. Coelho, D.S. and P.M. Domingos, *Physiological roles of regulated Ire1 dependent decay*. *Front Genet*, 2014. **5**: p. 76.
 30. Hetz, C. and F.R. Papa, *The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control*. *Mol Cell*, 2018. **69**(2): p. 169-181.
 31. Yoshida, H., et al., *XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor*. *Cell*, 2001. **107**(7): p. 881-91.
 32. Maurel, M., et al., *Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation*. *Trends Biochem Sci*, 2014. **39**(5): p. 245-54.
 33. Hollien, J., et al., *Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells*. *J Cell Biol*, 2009. **186**(3): p. 323-31.
 34. Han, D., et al., *IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates*. *Cell*, 2009. **138**(3): p. 562-575.
 35. Bright, M.D., et al., *Cleavage of BLOC1S1 mRNA by IRE1 Is Sequence Specific*,

- Temporally Separate from XBP1 Splicing, and Dispensable for Cell Viability under Acute Endoplasmic Reticulum Stress.* Mol Cell Biol, 2015. **35**(12): p. 2186-202.
36. Ghosh, R., et al., *Allosteric inhibition of the IRE1alpha RNase preserves cell viability and function during endoplasmic reticulum stress.* Cell, 2014. **158**(3): p. 534-48.
 37. Yamamoto, K., et al., *Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II.* J Biochem, 2004. **136**(3): p. 343-50.
 38. Fink, E.E., et al., *XBP1-KLF9 Axis Acts as a Molecular Rheostat to Control the Transition from Adaptive to Cytotoxic Unfolded Protein Response.* Cell Rep, 2018. **25**(1): p. 212-223.e4.
 39. Reimold, A.M., et al., *Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1.* Nature, 2001. **412**(6844): p. 300-7.
 40. Bettigole, S.E., et al., *The transcription factor XBP1 is selectively required for eosinophil differentiation.* Nature immunology, 2015. **16**(8): p. 829-837.
 41. Malhotra, J.D. and R.J. Kaufman, *Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword?* Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(12): p. 2277-93.
 42. Shaffer, A.L., et al., *XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation.* Immunity, 2004. **21**(1): p. 81-93.
 43. Martinon, F., et al., *TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages.* Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 411-8.
 44. Tavernier, S.J., et al., *Regulated IRE1-dependent mRNA decay sets the threshold for dendritic cell survival.* Nat Cell Biol, 2017. **19**(6): p. 698-710.
 45. Osorio, F., B.N. Lambrecht, and S. Janssens, *Antigen presentation unfolded: identifying convergence points between the UPR and antigen presentation pathways.* Curr Opin Immunol, 2018. **52**: p. 100-107.
 46. Chen, Z., et al., *Intratumoral CD8(+) Cytotoxic Lymphocyte Is a Favorable Prognostic Marker in Node-Negative Breast Cancer.* PLoS ONE, 2014. **9**(4): p. e95475.
 47. Fridman, W.H., et al., *The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome.* Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 298-306.
 48. Tran Janco, J.M., et al., *Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis.* J Immunol, 2015. **194**(7): p. 2985-91.
 49. Gardner, A. and B. Ruffell, *Dendritic Cells and Cancer Immunity.* Trends in immunology, 2016. **37**(12): p. 855-865.
 50. Yanofsky, V.R., et al., *Understanding Dendritic Cells and Their Role in Cutaneous Carcinoma and Cancer Immunotherapy.* Clinical and Developmental Immunology, 2013. **2013**: p. 624123.
 51. Roberts, E.W., 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): p. 324-336.
52. Scarlett, U.K., et al., *Ovarian cancer progression is controlled by phenotypic changes in dendritic cells*. J Exp Med, 2012. **209**(3): p. 495-506.
 53. Cubillos-Ruiz, J.R., et al., *ER Stress Sensor XBP1 Controls Anti-tumor Immunity by Disrupting Dendritic Cell Homeostasis*. Cell, 2015. **161**(7): p. 1527-38.
 54. Anderson, K.G., I.M. Stromnes, and P.D. Greenberg, *Obstacles Posed by the Tumor Microenvironment to T cell Activity: A Case for Synergistic Therapies*. Cancer Cell, 2017. **31**(3): p. 311-325.
 55. Galati, D., et al., *Dendritic cells in hematological malignancies*. Critical Reviews in Oncology / Hematology, 2016. **108**: p. 86-96.
 56. Bettigole, S.E. and L.H. Glimcher, *Endoplasmic reticulum stress in immunity*. Annu Rev Immunol, 2015. **33**: p. 107-38.
 57. Mahadevan, N.R., et al., *Transmission of endoplasmic reticulum stress and pro-inflammation from tumor cells to myeloid cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(16): p. 6561-6.
 58. Mahadevan, N.R., et al., *Cell-Extrinsic Effects of Tumor ER Stress Imprint Myeloid Dendritic Cells and Impair CD8(+) T Cell Priming*. PLoS ONE, 2012. **7**(12): p. e51845.
 59. Cubillos-Ruiz, J.R., S.E. Bettigole, and L.H. Glimcher, *Tumorigenic and Immunosuppressive Effects of Endoplasmic Reticulum Stress in Cancer*. Cell, 2017. **168**(4): p. 692-706.
 60. Cubillos-Ruiz, J.R., S.E. Bettigole, and L.H. Glimcher, *Molecular Pathways: Immunosuppressive Roles of IRE1alpha-XBP1 Signaling in Dendritic Cells of the Tumor Microenvironment*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(9): p. 2121-6.
 61. Bi, M., et al., *ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth*. Embo j, 2005. **24**(19): p. 3470-81.
 62. Drogat, B., et al., *IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo*. Cancer Res, 2007. **67**(14): p. 6700-7.
 63. Song, M., et al., *IRE1 α -XBP1 controls T cell function in ovarian cancer by regulating mitochondrial activity*. Nature, 2018. **562**(7727): p. 423-428.
 64. Guo, Y., et al., *A retinoic acid--rich tumor microenvironment provides clonal survival cues for tumor-specific CD8(+) T cells*. Cancer Res, 2012. **72**(20): p. 5230-9.
 65. Mach, N., et al., *Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand*. Cancer Res, 2000. **60**(12): p. 3239-46.
 66. Gleisner, M.A., et al., *Delivery of alloantigens via apoptotic cells generates dendritic cells with an immature tolerogenic phenotype*. Transplant Proc, 2011. **43**(6): p. 2325-33.
 67. Takata, A., et al., *Behavioral and gene expression analyses in heterozygous XBP1 knockout mice: Possible contribution of chromosome 11qA1 locus to prepulse*

- inhibition*. Neuroscience Research, 2010. **68**(3): p. 250-255.
68. He, Y., et al., *Emerging roles for XBP1, a sUPeR transcription factor*. Gene Expression, 2010. **15**(1): p. 13-25.
 69. Li, X., et al., *Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter*. J Biol Chem, 1998. **273**(52): p. 34970-5.
 70. Lee, A.H., et al., *Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1*. Science, 2008. **320**(5882): p. 1492-6.
 71. Hetz, C., et al., *Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha*. Science, 2006. **312**(5773): p. 572-6.
 72. Jackson, J.T., et al., *Id2 expression delineates differential checkpoints in the genetic program of CD8 α ⁺ and CD103⁺ dendritic cell lineages*. Embo j, 2011. **30**(13): p. 2690-704.
 73. Williams, J.W., et al., *Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2990.
 74. Satpathy, A.T., et al., *Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages*. J Exp Med, 2012. **209**(6): p. 1135-52.
 75. Zheng, Y., et al., *CD86 and CD80 Differentially Modulate the Suppressive Function of Human Regulatory T Cells*. The Journal of Immunology, 2004. **172**(5): p. 2778-2784.
 76. de Jonge, H.J.M., et al., *Evidence Based Selection of Housekeeping Genes*. PLOS ONE, 2007. **2**(9): p. e898.
 77. Coelho, D.S. and P.M. Domingos, *Physiological roles of regulated Ire1 dependent decay*. Front Genet, 2014. **5**: p. 76.

ANEXO

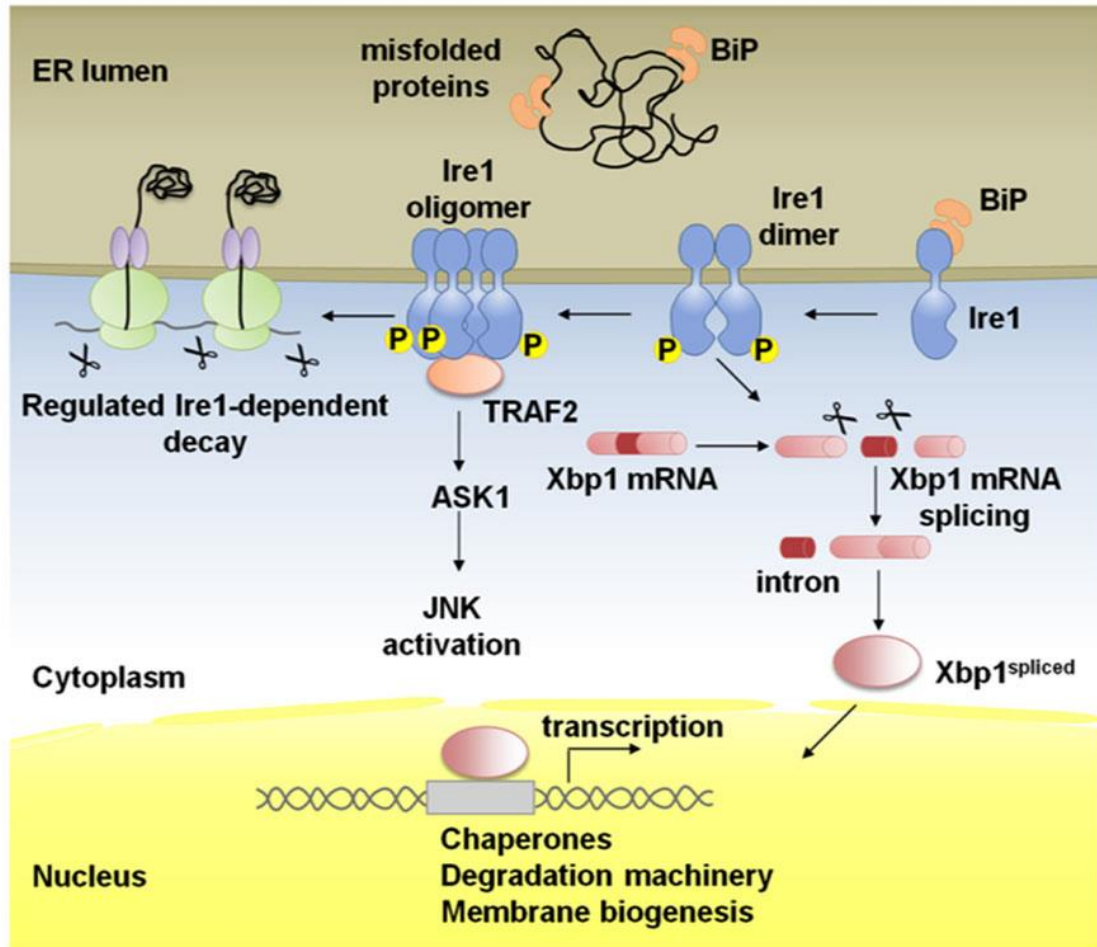


Figura suplementaria 1. Esquema del eje IRE1 α de la UPR. Sacado de ^[77]

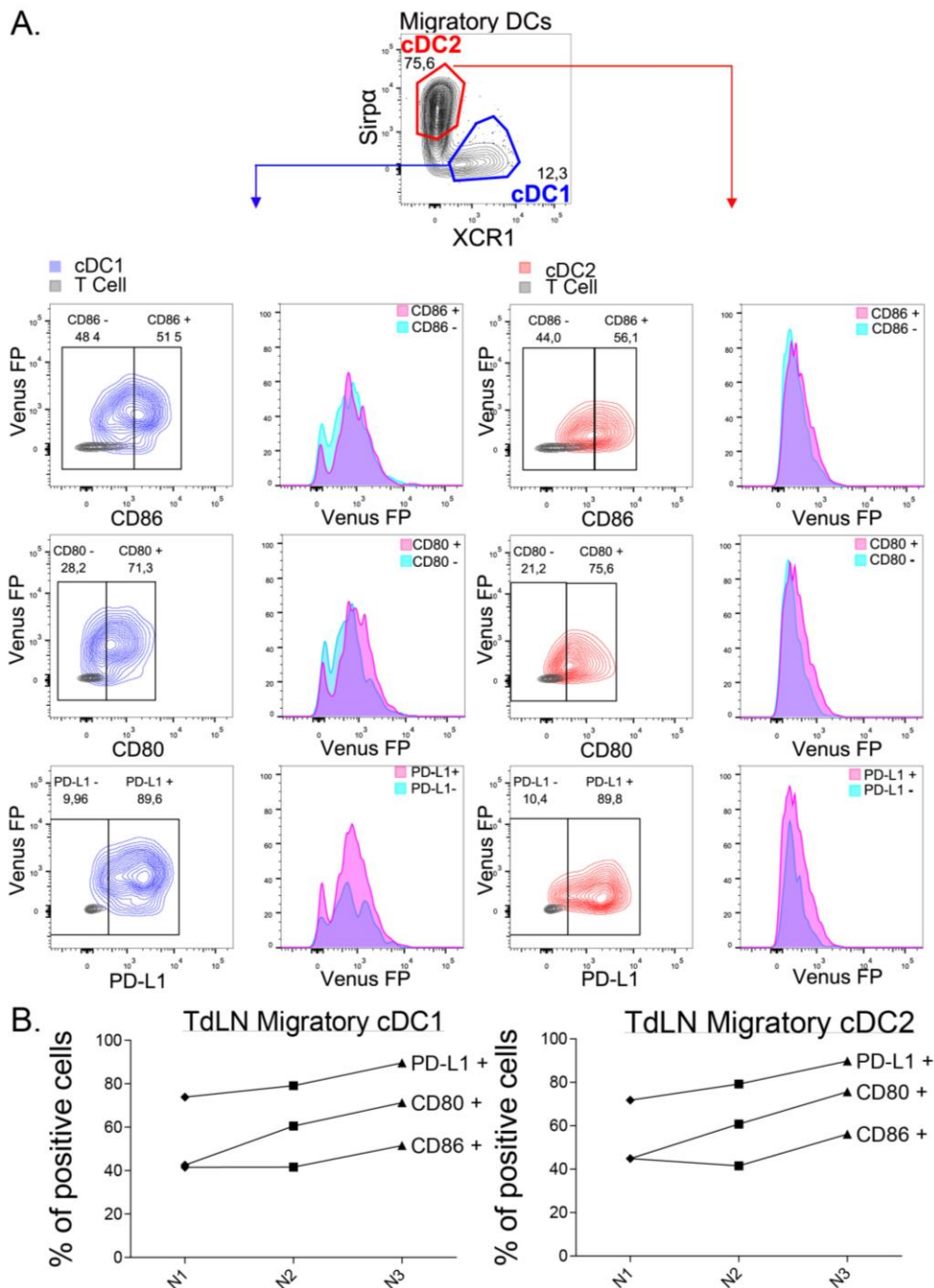


Figura suplementaria 2. Relación de la activación de la vía IRE1 α y la Inducción inmunogénica en cDC1 Migratorias de TdLN. (A) Relación entre la Intensidad media de fluorescencia (MFI) de Venus-FP para cDC1 (azul) de TdLN de tumor B16-OVA de ratones ERAI; y el grado de activación de marcadores de superficie CD80, CD86 y PD-L1. A la derecha se muestran los histogramas de la fluorescencia de Venus-FP para las poblaciones positivas y negativas de cada marcador. Los datos corresponden a un concatenado de tres experimentos independientes. (B) Porcentaje de células positivas para cada marcador dentro del total de cDC1 de los datos mostrados en A.

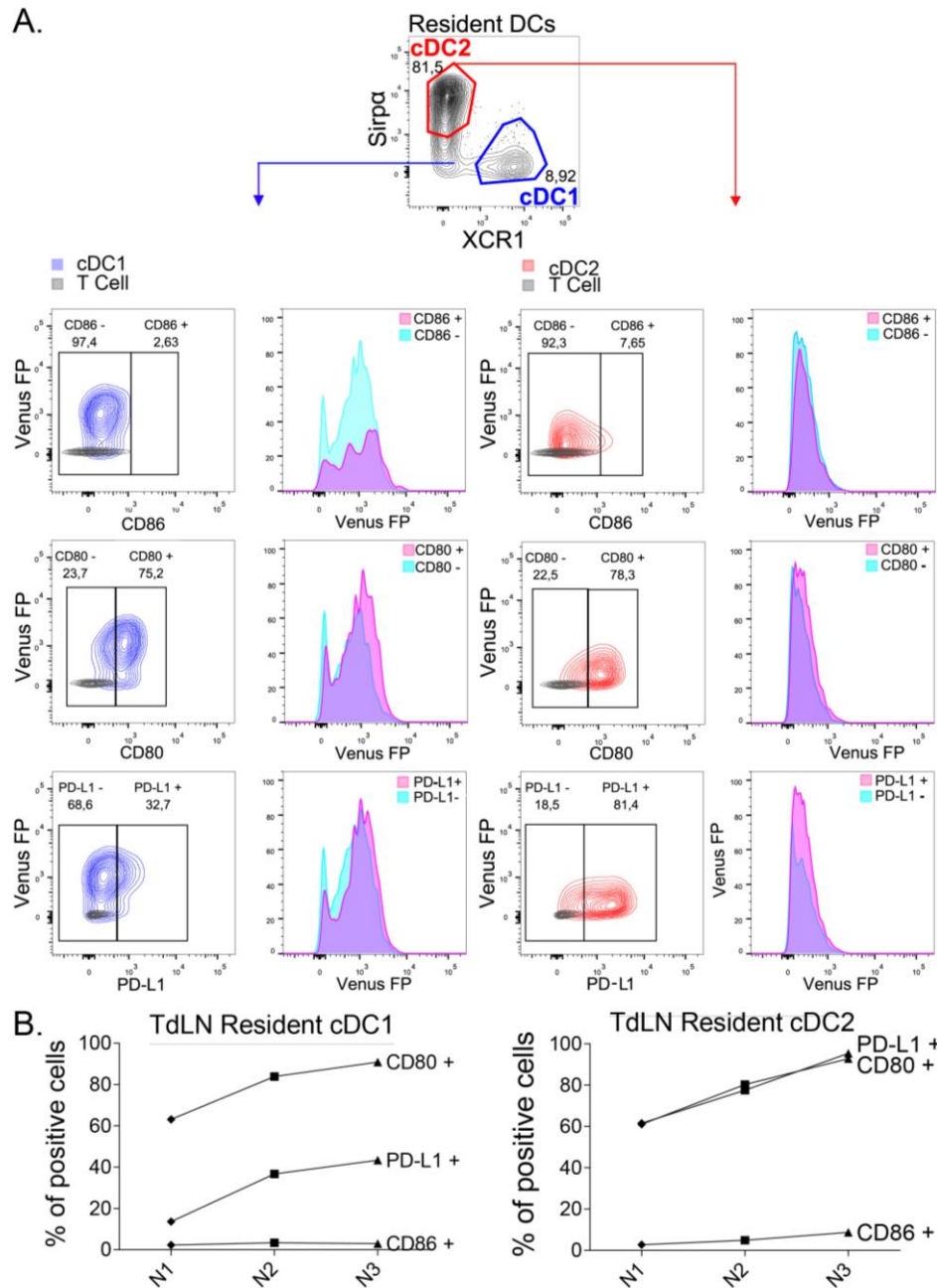


Figura suplementaria 3. Relación de la activación de la vía IRE1 α y la Inducción de inmunogenicidad en cDC1 Residentes de TdLN. (A) Relación entre la Intensidad media de fluorescencia (MFI) de Venus-FP para cDC1 (azul) de TdLN de tumor B16-OVA de ratones ERAI; y el grado de activación de marcadores de superficie CD80, CD86 y PD-L1. A la derecha se muestran los histogramas de la fluorescencia de Venus-FP para las poblaciones positivas y negativas de cada marcador. Los datos corresponden a un concatenado de tres experimentos independientes. (B) Porcentaje de células positivas para cada marcador dentro del total de cDC1 de los datos mostrados en A.

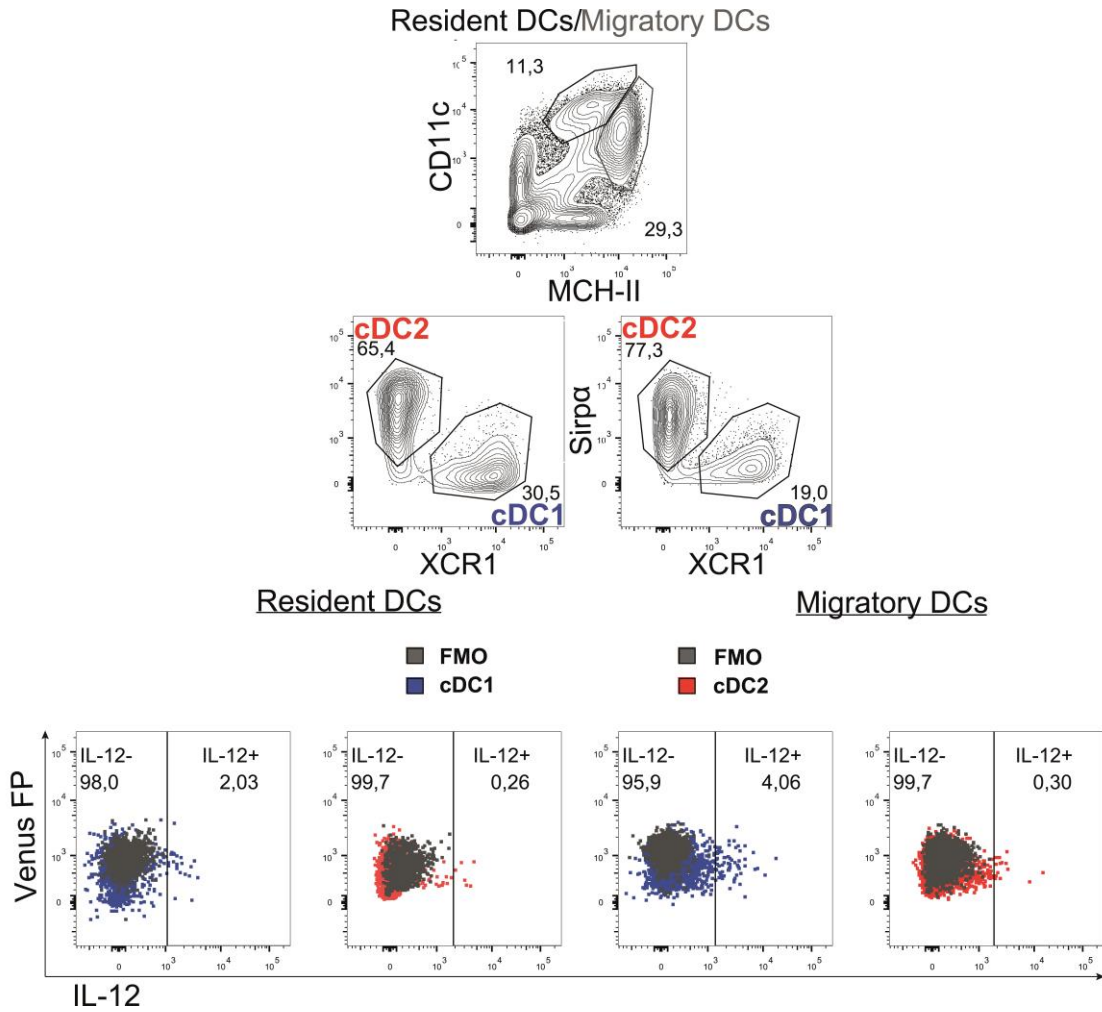


Figura suplementaria 4. Relación de la activación de la vía IRE1 α y la Inducción inmunogenicidad en cDC1 y cDC2 de TdLN. (A) Relación entre la Intensidad media de fluorescencia (MFI) de Venus-FP para cDC1 (azul) y cDC2 (rojo) de TdLN de tumor B16-OVA de ratones ERAI; y la cantidad de IL-12 intracelular en cada subtipo. Se muestran las DCs residentes (izquierda) y las migratorias (derecha). Los datos representan un solo ratón.

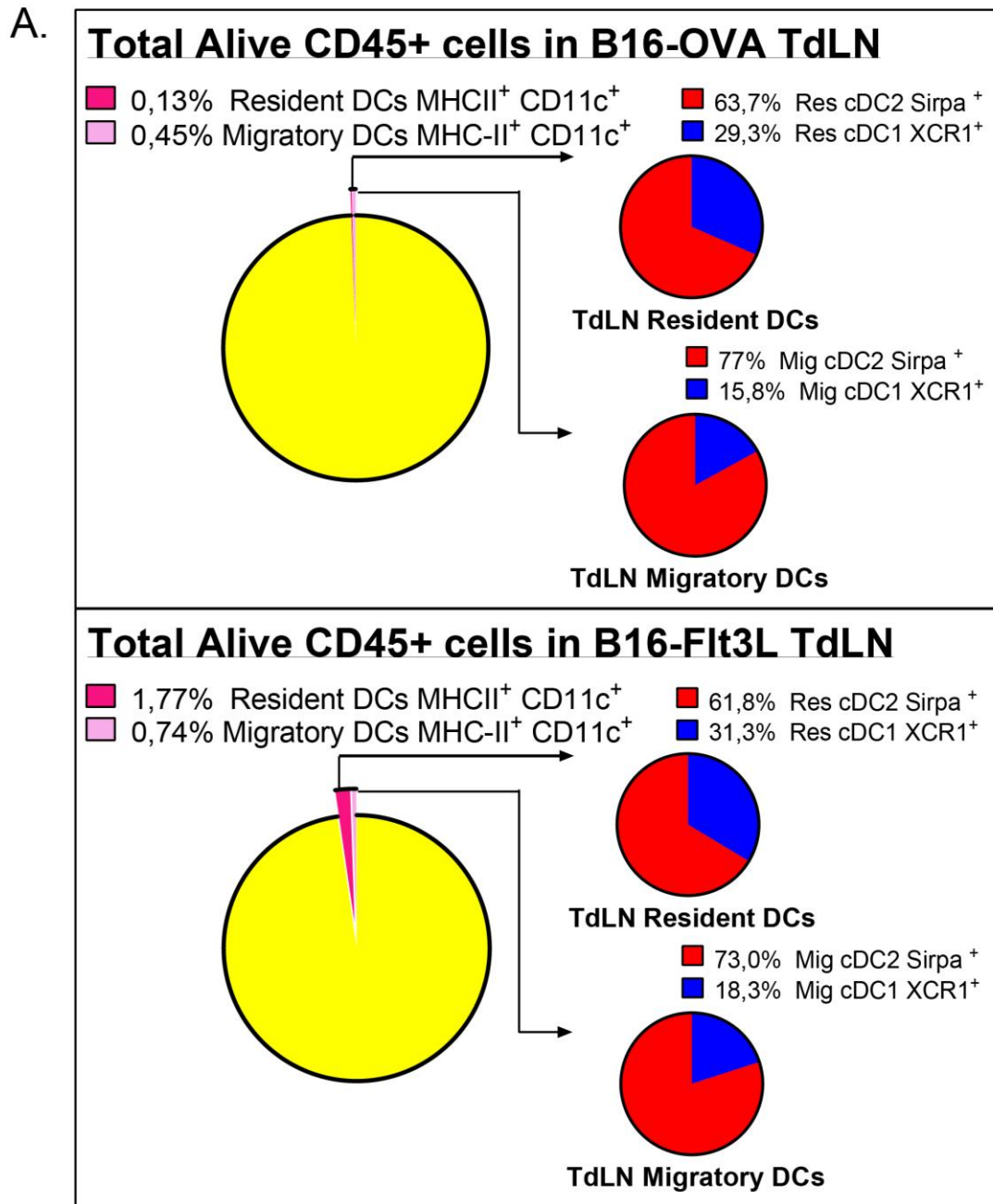


Figura suplementaria 5. Expansión poblaciones de cDCs en TdLN de ratones con tumor B16-Flt3L. Comparación del porcentaje de células dendríticas MHC-II+CD11c+ residentes y migratorias dentro de la población de células vivas de linfonodo drenante de tumor B16-OVA y de linfonodo drenante de tumor B16-Flt3L. Además, se indica el porcentaje de cDC1 y cDC2 dentro del total de tanto DCs Residentes como DCs migratorias.