

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Tecnología Médica



TESIS PROFESIONAL

Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en morfofisiopatología y
citodiagnóstico

“Evaluación de la interacción proteína-proteína de CCR5 y Panexina 1 en cáncer de colon”

Alumno: Catalina Araceli Araneda Ibáñez

Tutor/a: Prof. Marcela Hermoso Ramello, PhD¹

Prof. Marjorie De la Fuente López, PhD²

1. Laboratorio de inmunidad innata, Programa de inmunología, ICBM, Facultad de medicina
Universidad de Chile.
2. Laboratorio de Investigación en Biomedicina, Escuela de Medicina, Universidad Finis Terrae.

Fecha: 08 Julio, año 2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Tecnología Médica



TESIS PROFESIONAL

Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en morfofisiopatología y
citodiagnóstico

**“Evaluación de la interacción proteína-proteína de CCR5 y Panexina
1 en cáncer de colon”**

Catalina Araneda Ibáñez

Marcela Hermoso Ramello

Marjorie De la Fuente López

ACTA CURSO TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

La **Srta. Catalina Araceli Araneda Ibáñez**, estudiante de Tecnología Médica con Mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico, cumpliendo con los requisitos establecidos en el plan de estudio, realizó durante el noveno semestre de la carrera, la Tesis Profesional titulada: **“Evaluación de interacción proteína-proteína de CCR5 y Panexina 1 en células de cáncer de colón”**, dirigida por la **Prof. Marcela Hermoso Ramello**, académica del programa de Inmunología del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y la **Prof. Marjorie De la Fuente**, académica de la Universidad Finis Terrae.

La Escuela de Tecnología Médica designó para su corrección una Comisión integrada por: **Prof. Carolina Valck** académico del Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y la prof. **Glauben Landskron** académica de la Universidad Finis Terrae.

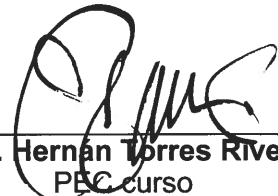
La calificación obtenida se detalla a continuación:

Corrector 1 Carolina Valck	7.00	25%
Corrector 2 Glauben Landskron	7.00	25%
Tutor(es) Guía:		
Evaluación intermedia	7.00	25%
Nota final tutor	7.00	25%
Nota final tesis profesional	7.00	

En consecuencia el estudiante **Catalina Araceli Araneda Ibáñez** aprueba satisfactoriamente la asignatura.



Prof. Maroly Müller Sobarzo
Coordinador(a) curso
Trabajo de Investigación



Prof. Hernán Torres Rivera
PEC curso
Trabajo de Investigación

Dedicatoria

El presente trabajo quiero dedicárselo a la persona que me inspiró a formar parte de este equipo de investigación y contribuir en los estudios que conllevan el cáncer de colon. A mi abuela Maria Cristina Hormazábal Vera, que en paz descanse, quien durante tres largos años, nos dio el ejemplo, enfrentando con positivismo y resiliencia esta difícil y dolorosa enfermedad.

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Dra. Marcela Hermoso y Dra Marjorie De la Fuente, quienes con paciencia y dedicación me guiaron durante todo el proceso, brindándome sus conocimientos y consejos. También, quiero agradecer a todo el equipo del Laboratorio de Inmunidad Innata de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, quienes me recibieron con amabilidad y me otorgaron el espacio y materiales necesarios para llevar a cabo esta tesis. Finalmente, agradezco a mi familia; a mis padres quienes estuvieron todo el proceso dándome ánimo y confort. Y a mi hermana quien en los días más oscuros lograba sacarme una sonrisa.

Este trabajo fue financiado por el proyecto N°11190990 del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico del Ministerio de Educación del Gobierno de Chile-ICBM

Índice

Resumen	1
Introducción	2
Generalidades cáncer colorrectal	2
El microambiente tumoral y sus mediadores inflamatorios	5
El receptor CCR5 y su relación con el cáncer	8
Panexina 1 y su relación con el cáncer	9
Relación entre CCR5 y Panexina 1	11
Hipótesis	13
Objetivo principal	13
Objetivos específicos	13
Materiales y métodos	14
Pacientes	14
Biopsias de tejido sano y tumoral de pacientes con cáncer de colon	14
Inmunofluorescencia indirecta en tejidos sanos y tumorales	15
Ensayo de ligación por proximidad en tejidos sanos y tumorales	17
Procesamiento digital de imágenes	19
Análisis estadístico	23
Resultados	24
Inmunofluorescencia indirecta doble de CCR5 y Panexina 1	24
Análisis de colocalización de CCR5 y Panexina 1	28
Análisis de la interacción entre CCR5 y Panexina 1	31
Discusión	36
Conclusión	41
Bibliografía	42
Anexos	47

Resumen

CCR5 es un receptor acoplado a proteína G, cuya expresión se ha visto aumentada en células tumorales de cáncer de colon. Se ha demostrado que esta expresión presenta una relación directa con los estadios tumorales, viéndose en mayor cantidad en aquellos estadios tumorales más avanzados. Por otro lado, Panexina 1 corresponde a un hemicanal capaz de liberar ATP, la cual se encuentra sobre-expresada en diferentes tipos de cánceres como son el melanoma y el cáncer de mama; sin embargo, en cáncer de colon no existen antecedentes. Recientemente, se demostró que la activación de CCR5 puede inducir la apertura de Panexina 1, formando parte del mecanismo de entrada del VIH en linfocitos CD4⁺. Resultados preliminares de nuestro laboratorio demostraron una correlación positiva en la expresión relativa de CCR5 y Panexina 1 en cáncer de colon, principalmente en células tumorales; sin embargo, la interacción entre ambas proteínas no ha sido evaluada aún en este cáncer. Dado lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la interacción proteína-proteína entre CCR5 y Panexina 1 en muestras de mucosa colónica normal o tumoral de pacientes con cáncer de colon, mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) doble, estudios de colocalización y ensayo de ligación por proximidad. Los resultados para IFI doble (prueba Mann-Whitney y Wilcoxon; $P < 0,05$) arrojaron que CCR5 y Panexina 1 presentan una tendencia a aumentar en tejidos tumorales. Además, estudios de colocalización entre las señales de CCR5 y Panexina 1 demostraron colocalización parcial en tejidos sanos y tumorales. Y, la cuantificación de señales PLA (prueba Mann-Whitney y Wilcoxon; $P < 0,05$) arrojaron que existe mayor interacción entre ambas proteínas en estadios tumorales avanzados (III). Estos resultados sugieren que esta interacción podría estar formando parte de alguna etapa del proceso de carcinogénesis del cáncer de colon. **Palabras claves:** Cáncer colorrectal, CCR5, Panexina 1, ensayo de ligación por proximidad (PLA por su sigla en inglés), Inmunofluorescencia indirecta doble.

Introducción

Generalidades cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal corresponde a tumores malignos del intestino grueso que comprenden a lesiones neoplásicas ubicadas desde la válvula ileocecal hasta el recto (1). A nivel mundial, según datos del sitio web Globocan de la Organización mundial de la salud (OMS) del año 2020, es el tercer cáncer con mayor incidencia, presentando una tasa de 19,5 por 100.000 habitantes (2) y es el segundo en mortalidad para ambos sexos, con un número estimado de 935.173 muertes en ese año (1). Se ha visto que las tasas de incidencia y de mortalidad son marcadamente más altas en hombres con respecto a las tasas presentadas en mujeres, siendo 3 a 4 veces más común en países con mayor desarrollo versus los países en vías de desarrollo (3,4). Mientras que en Chile, según el último informe del Departamento de Estadísticas e Información de Salud (DEIS) se ha estimado que entre los años 2000 y 2016 la tasa de mortalidad ajustada aumentó de 5,91 a 7,19 por 100.000 habitantes en cáncer de colon y de 1,67 a 1,99 por 100.000 habitantes en cáncer de recto (1). Sumado a lo anterior, para el año 2020 según la página Globocan de la OMS, se estimó para Chile una tasa de incidencia para el cáncer colorrectal de 19,9 por 100.000 habitantes y una tasa de mortalidad de 9,4 por 100.000 habitantes (2). Dado lo mencionado anteriormente, se estima que la incidencia mundial hacia el año 2035 aumentará de los 1,4 millones reportados en el 2012 a 2,4 millones para el año 2035 (5), convirtiendo al cáncer colorrectal en uno de los principales problemas de salud pública.

La etiología del cáncer colorrectal es variada, siendo los casos esporádicos los más frecuentes (85%), seguidos de los cánceres con patrón familiar (10%) y hereditario (5%) (6). El cáncer colorrectal esporádico se caracteriza por presentar pacientes diagnosticados sobre los 50 años de edad y sin antecedentes familiares (6). El 90 % de los casos esporádicos presentan una

carcinogénesis basada en el modelo “adenoma-carcinoma” propuesto por Fearon y Vogelstein (6), el cual incluye múltiples etapas de adquisición progresiva de diferentes mutaciones somáticas en genes como APC, RAS y Tp53 que van a conducir a la transformación maligna de la mucosa colorrectal sana, comenzando con una proliferación no neoplásicas de las células epiteliales y la formación de pólipos, los cuales pueden establecerse durante años antes de desarrollar lesiones premalignas denominadas adenomas, que con el tiempo se malignizan estableciendo los adenocarcinomas invasores (4,6). El adenocarcinoma es el tipo histológico más común, representando el 98% de los casos (7). Suelen aparecer como masas exofíticas únicas polipoides o ulceradas, cuya histología principal suele observarse con la presencia de glándulas tubulares bien, moderada o pobremente diferenciadas conformadas por células epiteliales neoplásicas de la mucosa colorrectal (8). En aquellas lesiones más avanzadas se distinguen conglomerados celulares sin organización aparente, que invaden el estroma adyacente, afectando vasos sanguíneos y linfáticos que posteriormente pueden establecer metástasis (4,7). Solo el 10% de los casos de adenomas progresan a una neoplasia invasiva, aunque el riesgo de cáncer aumenta a medida que el pólipo crece (4).

Como se mencionó anteriormente, el cáncer colorrectal esporádico es el más frecuente, sin embargo, es posible encontrar casos de cáncer colorrectal asociados a factores de riesgo hereditario, donde se encuentran aquellos con patrón familiar (10%), derivados de una susceptibilidad hereditaria moderadamente penetrante y que posiblemente están interactuando con factores ambientales (6). Por otro lado, en el 5% de los casos, el cáncer puede ser causado por un síndrome hereditario, que suelen presentarse a edades inferiores de los 50 años y están asociados a mutaciones genéticas heredables altamente penetrantes, que otorgan un alto riesgo de padecer el cáncer, siendo los más frecuentes el síndrome de Lynch con 5-3% de los casos, seguido de la poliposis adenomatosa familiar con > 1% de los casos (6).

Además de los factores de riesgo asociados a la genética, también se ha encontrado una estrecha relación entre el desarrollo del cáncer colorrectal y los factores de riesgo ambientales que involucran los estilos de vida del paciente, como es el tabaquismo, la dieta, ingesta alcohólica y la obesidad (9). Se ha visto que la obesidad es uno de los contribuyentes conductuales más significativo a la hora de desarrollar cáncer colorrectal (4); esta involucra al tejido adiposo que se caracteriza por desarrollar un ambiente inflamatorio rico en citoquinas pro-tumorales, las cuales son liberadas al torrente sanguíneo (4). También, existen factores de riesgo asociados a enfermedades inflamatorias intestinales, donde pacientes que padecen de colitis ulcerosa o de la enfermedad de Crohn tienen el doble de riesgo de padecer cáncer colorrectal (4), otorgando un ambiente inflamatorio crónico, con una liberación anormal de citoquinas de crecimiento, exceso de flujo sanguíneo, radicales libres metabólicos y otros factores que predisponen a la carcinogénesis (4).

El cáncer colorrectal progresa a través de la extensión que alcanzan las células invasoras en la pared del colon o recto. Según el nivel de extensión de la invasión se determina la estadificación y pronóstico al diagnosticar el cáncer colorrectal (4). Información aportada por el comité conjunto estadounidense sobre el cáncer (AJCC), el estadio 0 o carcinoma in situ corresponde a un cáncer de etapa temprana que se limita únicamente a la mucosa del colon o recto. El estadio I corresponde a un cáncer que se extiende hacia la muscular de la mucosa, submucosa (T1) o muscular propia (T2), sin propagarse a ganglios linfáticos cercanos (N0) y órganos distantes (M0). El estadio II corresponde al cáncer que se extiende más allá de la pared del colon o recto, pudiendo comprometer estructuras adyacentes (T3 o T4), sin embargo no poseen compromiso a ganglios linfáticos (N0) ni en lugares distantes (M0). El estadio III corresponde al cáncer que se extiende más allá de la pared del colon o recto (T1,T2,T3,T4), comprometiendo linfonodos (N1 y N2), pero sin diseminación a órganos distantes (M0). Finalmente, el estadio IV corresponde a los cánceres que

crecen más allá de la pared del colon (con cualquier T y N) y que se han diseminado a órganos distantes, estableciendo metástasis (M1) siendo los órganos más frecuentemente comprometidos los pulmones y el hígado (10).

El microambiente tumoral y sus mediadores inflamatorios

Las comunicaciones entre las células de un tejido y su entorno extracelular desempeñan un papel fundamental a nivel fisiológico, promoviendo la homeostasis tisular y permitiendo su correcto funcionamiento (11). Bajo ciertas circunstancias se puede perder dicha homeostasis, creando un ambiente que favorece el desarrollo de procesos inflamatorios (11). La inflamación, corresponde a una serie de eventos que se desencadenan frente a noxas o estímulos nocivos, que involucran la participación de células y mediadores inflamatorios, que en una situación fisiológica normal logran enfrentar y reparar el daño generado, eliminando al agente causante y restableciendo la homeostasis perdida (11). Por el contrario, se sabe que las respuestas inflamatorias juegan un rol fundamental en las diferentes etapas de la carcinogénesis, siendo parte de la iniciación, promoción, conversión maligna, invasión y metástasis (12). Es un hecho que la respuesta inflamatoria desregulada y crónica favorece la transformación celular maligna y por consiguiente el riesgo de padecer cáncer (12). Un ejemplo de lo anterior son las inflamaciones crónicas que caracterizan a las enfermedades inflamatorias intestinales, que como ya se mencionó anteriormente, corresponden a factores de riesgo en cuanto a la generación del cáncer colorrectal (12).

Además, los tumores se caracterizan por desarrollar una respuesta inflamatoria intrínseca, capaz de desencadenar un microambiente protumoral compuesto por células propias de la respuesta inmune innata (macrófagos, neutrófilos, mastocitos, células supresoras derivadas de mieloides, células dendríticas y células asesinas naturales), la respuesta inmune adaptativa (linfocitos B y T) y

sus propias células neoplásicas en conjunto con el estroma circundante (fibroblastos, endotelio, mesénquima, etc) (12). Las células inmunes más frecuentes dentro del microambiente tumoral son los macrófagos asociados a tumores (MAT) y los linfocitos T (12). Los MAT corresponden a una población heterogénea de células dependientes de la disponibilidad de oxígeno y de la progresión tumoral, que según la “hipótesis del equilibrio de los macrófagos” de Mantovani, son capaces de promover o inhibir el crecimiento tumoral, la angiogénesis, la invasión y la metástasis según su polarización funcional y su estado de activación (12,13,14). Así, los macrófagos tipo 1 (M1) que tienden a aparecer en etapas tempranas del desarrollo tumoral (14), se caracterizan por presentar una respuesta proinflamatoria y antitumoral, capaz de promover la inmunidad con la liberación de factores inflamatorios como IL-6, IL-12 y factor de necrosis tumoral (TNF), que atraen y estimulan el desarrollo de células Th1, Th17 y NK (15). Por el contrario, el fenotipo de macrófagos tipo 2 (M2) tiende a aparecer en etapas avanzadas o hipóxicas del desarrollo tumoral (14) y se caracterizan por desarrollar una respuesta antiinflamatoria que favorece el crecimiento tumoral y la metástasis. Son capaces de inhibir la inmunidad contra el cáncer a través de la producción del factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β) e IL-10 (15) y la liberación de factores que favorecen el reclutamiento de Th2, además de expresar citoquinas como CCL17, CCL22 y CCL24, que favorecen el desarrollo de células T reguladoras (14). Tienden a asociarse a tumores de peor pronóstico (14).

Otro tipo de célula que participa del microambiente tumoral son los linfocitos T, que de acuerdo al contexto en el que se encuentren pueden estar ejerciendo efectos supresores y/o promotores de tumores (12). Por ejemplo, el aumento de células T, específicamente células Th1 y T CD8+ citotóxicas activadas, se correlaciona con una mejor supervivencia en algunos tipos de cáncer, incluido el cáncer de colon invasivo (16). Sin embargo, hay evidencia de que muchos de los subtipos de células T están involucrados en la promoción, progresión o metástasis del tumor, incluyendo a las células Th1 productoras de IFN γ (17), células Th2 (18) y células Th17 (19). Y, en

conjunto con los MAT, la acción protumorigénica de los linfocitos está mediada por múltiples citoquinas y quimioquinas (12).

Las quimioquinas son proteínas de bajo peso molecular pertenecientes a la familia de las citoquinas, estas se clasifican en cuatro grupos diferentes: CXC, CC, CX3C o C y se asocian a un receptor, cuya nomenclatura sigue al de las quimioquinas, es decir, aquellas CC se unen a los receptores de quimioquinas CC, los ligandos CXC se unen a CXC receptores, etc (20). Estas poseen variadas funciones de las cuales se destacan mediar la comunicación célula a célula, regular la proliferación, supervivencia celular, diferenciación, activación de células inmunes, migración y muerte celular (11). Sin embargo, estas mismas funciones pueden formar parte de la carcinogénesis de diferentes tumores, incluyendo al cáncer de colon, donde el aumento del contenido de citoquinas y quimioquinas le otorgan al tejido tumoral ventajas con respecto al tejido sano, participando en procesos que favorecen el crecimiento, progresión y angiogénesis tumoral (11,21). Generalmente en el cáncer, las quimioquinas y sus receptores juegan un rol fundamental en el tráfico de células dentro y fuera del microambiente tumoral (20). Hay quimioquinas que controlan el entorno inmunitario e inflamatorio para favorecer la inmunidad antitumoral (IL-12, TRAIL, IFN γ) y otras que favorecen la progresión tumoral (IL-6, IL-17, IL-23); también hay aquellas que tienen efectos directos sobre el crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas (TRAIL, FasL, TNF- α , ligandos EGFR, TGF- β , IL-6) (12).

En el contexto del cáncer colorrectal, se ha visto un aumento en la expresión de CCL3 y CCL4, quimioquinas importantes en generar una red quimiotáctica fundamental para el reclutamiento de monocitos/macrófagos y linfocitos T (13). Así apoyando lo anterior, un estudio realizado por de la Fuente et al. demostró que existe un aumento en la expresión de tales quimioquinas (CCL2, CCL3 y CCL4) en muestras de tejido tumoral versus su contraparte de tejido sano (22). En este mismo estudio, en aquellos tumores con niveles aumentados de CCL4, se observó una correlación directa

con marcadores de macrófagos tipo M2 (con fenotipo pro-tumoral), sugiriendo una posible participación de esta quimioquina en la infiltración de monocitos y macrófagos en el tejido tumoral (22). Sumado a lo anterior, según Erreni et al, independiente del estadio tumoral del cáncer colorrectal, se evidenció un incremento de las quimioquinas CCL3 y CCL4 en tejidos tumorales en relación a la mucosa colónica normal (13). Además, en conjunto con el aumento de estas quimioquinas, se encontró una sobreexpresión de receptores CCR1 y CCR5 en estos tejidos tumorales, sugiriendo que las quimioquinas tienen un papel fundamental en la migración, proliferación y progresión tumoral (13).

El receptor CCR5 y su relación con el cáncer

El receptor de quimioquinas CCR5 corresponde a un receptor acoplado a proteínas G, compuesto por siete dominios transmembrana cuya longitud varía entre 340 a los 370 aminoácidos (23). Se expresa regulando el tráfico y funciones efectoras en linfocitos T, monocitos/macrófagos, células dendríticas y células epiteliales (23). CCR5 es afín a múltiples ligandos, incluidos CCL3 (MIP1 α), CXCL13 (BCA-1), CCL4 (MP-1 β), CCL3L1, CCL8 (MCP2), CCL5 (RANTES), CCL11 (Eotaxina), CCL13 (MCP-4) y CCL16 (HCC-4) (24). Frente a la presencia de cualquiera de estos ligandos, se activan vías de señalización dependientes del receptor acoplado a proteínas G; estos sufren cambios conformacionales, con la disociación de las subunidades G α y G $\beta\gamma$ y en consecuencia la activación de diferentes vías de señalización dependientes de quimioquinas, específicamente la vía mediada por proteína Gq y Gi (24). Las subunidades G $\beta\gamma$ llevan a la activación de la fosfolipasa C γ , PIP2 e IP3, llevando a un rápido aumento del Ca⁺² citosólico (24). Además, CCR5 induce vías de señalización adicionales como son PI3K, PDK1, serina/treonina quinasa y proteína quinasa B (AKT) induciendo la supervivencia celular, glucólisis, proliferación celular, crecimiento y proliferación de células madres (24).

En el cáncer, CCR5 se expresa en varios tipos de células tumorales y se ha sugerido que la señalización dependiente de CCR5 contribuye a la migración y supervivencia de las células tumorales (25). Por ejemplo, se ha visto que en el cáncer de mama existe una relación entre CCL5/CCR5 viéndose que los niveles de expresión de ambos se encuentran aumentados y esto se correlaciona directamente con los diferentes subtipos genéticos que caracterizan a este cáncer (26). Así, hay una mayor expresión de CCL5 y CCR5 en los subtipos basal y HER-2 (26). Por otro lado, se sabe que CCR5 se expresa en células tumorales de cáncer de colon; según Suarez-Carmona et al. (27) a través de un estudio inmunohistoquímico en tejido neoplásico, se demostró la expresión de este receptor en células de tumores primarios, estableciendo una relación entre los niveles de expresión de CCR5 con el estadio T del sistema TNM, viéndose aumentada la expresión de CCR5 en estadios T3 y T4 versus estadios T2 (27). También, se determinó que tumores metastásicos de cáncer de colon presentan una mayor expresión de CCR5 en comparación a los tumores primarios, sugiriendo que el aumento en la expresión de CCR5, en células de tumores primarios en progresión, conlleva a la generación de un gradiente de quimioquinas mediado por CCL3, CCL4 y CCL5, contribuyendo a que estas células migren y se diseminen estableciendo una metástasis (27).

Panexina 1 y su relación con el cáncer

Panexina 1 corresponde a un hemicanal cuya estructura es muy similar a la de las conexinas, conformados por 4 dominios transmembrana, que presentan dos bucles extracelulares, un extremo N-terminal y C-terminal citosólicos (28). La familia de las Panexinas se clasifican en tres subtipos: la Panexina 1 que es ubicuamente expresada en todos los tejidos, la Panexina 2 principalmente expresado en el sistema nervioso central y la Panexina 3 encontrada en osteoblastos, fibroblastos sinoviales y condrocitos (28). Se sabe que la Panexina 1 actúa como un

poro transmembrana compuesto por seis subunidades que pueden oligomerizar en un hexámero (28). Comúnmente se encuentra cerrado y frente a la despolarización de membrana con aumentos del Ca^{+2} citosólico, cambios de voltaje, alto K^{+} extracelular o la distensión mecánica de la misma (inducida por vasoconstricción y vasodilatación) se genera la apertura y salida de ATP al espacio extracelular (28). El aumento del ATP extracelular genera la activación de receptores purinérgicos tipo P2 o activados por ATP/ADP en células inmunitarias y parenquimatosas, favoreciendo vías de señalización que inician procesos inflamatorios y de migración celular (28). Además, los canales Panexina 1 se pueden abrir irreversiblemente por la escisión de caspasas en su extremo carboxilo terminal, induciendo una liberación de ATP permanente y el reclutamiento de monocitos para eliminar a linfocitos por apoptosis (29). Cabe destacar, que el ATP es uno de los componentes principales del microambiente tumoral, siendo parte de la proliferación, motilidad y diseminación de las células cancerosas (30).

Panexina 1 se expresa en todo el epitelio colónico, incluyendo la submucosa y los ganglios entéricos; sin embargo, no se sabe muy bien la función de esta proteína en estos tejidos, se cree que puede aportar a la motilidad neuronal entérica, sugiriendo que tienen un rol importante en la fisiopatología del daño intestinal generado en las enfermedades inflamatorias intestinales (31). Sumado a lo anterior, es escasa la información de Panexina 1 en cáncer. Existen estudios que establecen una relación de Panexina 1 con el cáncer de mama (32) y con melanoma (33). En cáncer de mama existe un aumento de la expresión de Panexina 1, junto con un aumento de ATP extracelular que al actuar en receptores purinérgicos activa vías de señalización que inhiben la apoptosis, favoreciendo la proliferación y supervivencia celular, estando relacionados con diagnósticos de peor pronóstico (32). Por otro lado, en un modelo de melanoma inducido en ratón se observó una sobreexpresión de los receptores de Panexina 1 en células neoplásicas versus melanocitos normales, sugiriéndose un rol importante en la regulación de los procesos de proliferación y

crecimiento celular neoplásico (33). Además, se han identificado altos niveles de Panexina 1 endógena en líneas celulares de melanoma humano, biopsias y células de melanoma provenientes de tumores primarios, ganglionares y metastásicos, sugiriendo que el incremento de Panexina 1 pueden estar asociados con su comportamiento maligno y que por lo mismo pueden ser utilizados como potenciales objetivos terapéuticos (33).

Relación entre CCR5 y Panexina 1

Se sabe que la infección dada por el virus VIH involucra principalmente a células del sistema inmune, siendo los linfocitos T CD4⁺ los principales afectados (28). Gracias a estudios que se han desarrollado para comprender el mecanismo de entrada y replicación del virus, se sabe que la interacción del virus con CD4 y CCR5 o CXCR4, ubicadas en las membranas de los linfocitos T CD4⁺, son esenciales para completar la fusión de este con la membrana (28). Adicionalmente, se ha descubierto que en el proceso de entrada y replicación viral es necesaria la participación de CCR5 y CXCR4, seguidos de la activación de Panexina 1 y subsecuente liberación de ATP (Figura N°1). Así el incremento de los niveles de ATP extracelular favorece la activación de receptores purinérgicos tipo P2X1, con la consecuente entrada de calcio desde el espacio extracelular al lado citosólico, induciendo así finalmente la entrada del virus. El continuo estímulo de los receptores purinérgicos, generarán un incremento de calcio citosólico, el cual a su vez activa vías de señalización que favorecen la mantención y facilita las etapas posteriores del ciclo de vida del VIH (28).

Finalmente, en un estudio preliminar de nuestro grupo de investigación se evidenció mediante inmunohistoquímica un incremento de CCR5 y Panexina 1 en células tumorales de cáncer de colon en relación con el estroma del mismo tejido, junto con una correlación positiva entre la expresión relativa de CCR5 y Panexina 1, sugiriendo una posible relación entre estas moléculas en células tumorales de cáncer de colon (34).

En resumen, sabemos que existe un aumento de quimioquinas en el microambiente tumoral, destacando CCL2, CCL3 y CCL4 en el cáncer colorrectal; CCR5, un receptor de quimioquinas tales como CCL5, CCL3 y CCL4, que está sobreexpresado en células tumorales y sus niveles se relacionan con el estadio tumoral en cáncer colorrectal; Panexina 1 ha sido escasamente estudiada en cáncer, sin embargo, se ha visto aumentada su expresión en tumores de mama o melanomas, sugiriendo que este hemicanal tiene un rol fundamental en la progresión de dichos cánceres; además, en modelos de infección de linfocitos T CD4+ por VIH se identificó que la apertura del canal Panexina 1 puede ser mediada por la activación de CCR5. Sin embargo, aún no ha sido descrita una relación física, que involucra una interacción entre ambas proteínas en el contexto del cáncer, por lo mismo resulta atractivo evaluar el rol de la interacción entre CCR5 y Panexina 1 en cáncer de colon, ya que podría estar siendo parte de los diferentes procesos de patogénesis que involucra a la enfermedad. En el siguiente estudio se investigó y se llevó a cabo el análisis de la interacción proteína-proteína entre CCR5 y Panexina 1 en biopsias de pacientes con cáncer de colon, mediante estudios de colocalización con inmunofluorescencia indirecta doble y ensayos de ligación por proximidad (PLA según sus siglas en inglés *proximity ligation assay*).

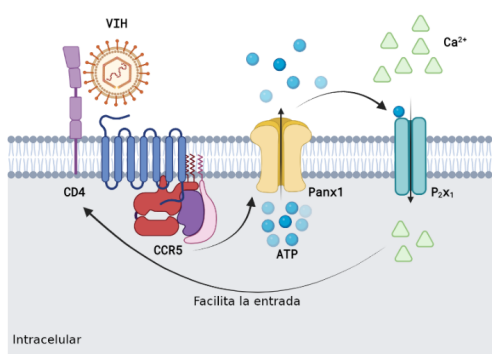


Figura N°1: Interacción entre CCR5 y Panexina 1 en la infección de linfocitos CD4⁺ por VIH. El VIH se une al receptor CD4 y a CCR5 ubicados en la membrana plasmática, induciendo la señalización intracelular que conduce a la apertura y activación de los hemicanales de Panexina 1, permitiendo la liberación de ATP al espacio extracelular. El ATP liberado se une a los receptores P2X1, lo que provoca la entrada de calcio, facilitando la entrada del VIH a la célula.

Hipótesis

- La proteína CCR5 interactúa con Panexina 1 en células de tejidos con cáncer de colon.

Objetivo principal

- Evaluar la interacción proteína-proteína entre CCR5 y Panexina 1 en cáncer de colon.

Objetivos específicos

1. Evaluar la expresión y colocalización de CCR5 y Panexina 1 mediante inmunofluorescencia indirecta doble, en biopsias de tejido sano y tumoral de pacientes con cáncer de colon.
2. Demostrar la interacción proteína-proteína entre CCR5 y Panexina 1 mediante ensayo de ligación por proximidad, en biopsias de tejido sano y tumoral de pacientes con cáncer de colon.

Materiales y métodos

Pacientes

A partir de biopsias extraídas de 26 pacientes adultos, de las que ya se cuenta con un análisis previo de expresión relativa de CCR5 y Panexina 1 a través de inmunohistoquímica (34), se caracterizaron biopsias de tejido sano y tumoral proveniente de 4 pacientes diagnosticados con cáncer de colon que fueron sometidos a resección quirúrgica en la Clínica Las Condes y el hospital clínico de la Universidad de Chile, ambos ubicados en la región Metropolitana en la ciudad de Santiago de Chile, entre los años 2015 y 2017. Para la selección de las muestras se consideró como criterio de inclusión muestras de pacientes con cáncer de colon, en etapas tempranas (estadio I) y avanzadas (estadio III). Esta elección se justifica dado que resultados preliminares identifican que la expresión de CCR5 y Panexina 1 están directamente relacionados con el estadio tumoral (34), por lo tanto la interacción de estas moléculas también podrían depender de sus niveles de expresión. Por el contrario, se excluyeron aquellos pacientes que tuvieran cáncer rectal, que hayan recibido radioterapia o quimioterapia previa y cuyos estadios tumorales correspondían a estadios II. El presente estudio fue aprobado por el comité de ética de Clínica Las Condes (Anexo N°5), donde se autorizó el uso de las muestras utilizadas en proyectos anteriores y las firmas de los consentimientos informados de los pacientes respectivos.

Biopsias de tejido sano y tumoral de pacientes con cáncer de colon

Para los 4 pacientes seleccionados, se consideraron los estadios tumorales correspondientes a estadio I o III y los altos niveles de expresión relativa de CCR5 y Panexina 1 en muestras representativas de cáncer de colon y tejido normal colónico, obtenidos por inmunohistoquímicas previas (34) (Tabla N°1). Se dispuso de biopsias de tejido sano y tumoral fijadas en paraformaldehído (PFA) 2% p/v entre 3 a 6 horas a temperatura ambiente e incluidas en parafina.

Los bloques obtenidos fueron cortados a un grosor de 3 μ m y recuperados en portaobjetos de vidrio cargados. Los cortes fueron almacenados a 4°C hasta su posterior uso.

Tabla N°1: Niveles de expresión relativa de CCR5 y Panexina 1 en biopsias de colon sano y tumoral.

Muestra	Estadio	Epitelio sano		Células tumorales	
		CCR5	Panexina 1	CCR5	Panexina 1
CE210	I	0,51	0,55	0,46	0,29
02.12.2015	I	0,05	0,1	0,12	0,18
CE211	III	0,3	0,32	0,44	0,65
CE222	III	0,31	0,3	0,63	0,76

Inmunofluorescencia indirecta (IFI) en tejidos sanos y tumorales de pacientes con cáncer de colon

Se realizaron IFI en tejidos dirigidas a la detección individual de las proteínas CCR5 y Panexina 1 en tejidos sanos y tumorales de colon. Los cortes de tejido fueron desparafinados y rehidratados en neoclear y baterías descendentes de etanoles, desde 100% hasta 70% respectivamente; seguido de recuperación antigénica en tampón EDTA pH 8 con la ayuda de una vaporera por 20 min; tratamiento con glicina 100 mM por 15 min; lavados en PBS 1X; bloqueo con BSA 2,5% por 1 hr; incubación de los anticuerpos primarios (a diferentes diluciones) policlonal de cabra anti-CCR5 (1:300 y 1:500) (*ab1673, Abcam, Cambridge, MA, USA*) y policlonal de conejo anti-Panexina1 (1:500; 3:500 y 1:50) (*ref: 710184, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific*) por separado, durante toda la noche a 4°C; se continuó con la incubación del anticuerpo secundario Donkey anti-cabra IgG (H+L) (1:200), *Alexa Fluor™ 594* y *Donkey anti-Rabbit IgG (H+L), DyLight™ 488*, los cuales fueron

diluidos en una solución de PBS 1X y Hoescht (1:500) e incubados por 1 hora a T°ambiente; finalmente se realizó el montaje en medio DAKO *anti-fade* y las láminas fueron almacenadas a 4°C hasta su visualización.

Las IFI fueron validadas realizando controles paralelos a la realización del experimento. Para cada condición se realizaron controles técnicos omitiendo los anticuerpos primarios correspondientes.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la IFI simple en tejidos, se seleccionó para CCR5 la dilución de 1:500, mientras que para Panexina 1 la dilución 1:50. Para la detección simultánea de CCR5 y Panexina 1 en estos tejidos sanos y tumorales, se realizaron IFI dobles, mediante la desparafinación y rehidratación de los tejidos en neoclear y baterías descendentes de etanoles, de 100% hasta 70% respectivamente; seguido de recuperación antigénica en vaporera por 20 min; tratamiento con glicina 100 mM por 15 min; lavados en PBS 1X; bloqueo con BSA 2,5% por 1 hr; incubación simultánea de los anticuerpos primarios policlona de cabra anti-CCR5 (1:500) (*ab1673, Abcam, Cambridge, MA, USA*) y policlona de conejo anti-Panexina-1 (1:50) (*ref: 710184, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific*) durante toda la noche a 4°C; incubación del anticuerpo secundario *Donkey anti-cabra IgG (H+L), Alexa Fluor™ 594* y *Donkey anti-Rabbit IgG (H+L), DyLight™ 488* (1:200), los cuales fueron diluidos en una solución de PBS 1X y Hoescht (1:500) e incubados por 1 hora a T°ambiente; finalmente se realizó el montaje en medio DAKO *anti-fade* y las láminas fueron almacenadas a 4°C hasta su visualización.

Las IFI dobles fueron validadas realizando controles paralelos a la realización del experimento. Se realizaron controles técnicos omitiendo los anticuerpos primarios correspondientes y controles de isotipo utilizando isotipo rabbit IgG (*ab171870, Abcam, Cambridge, MA, USA*) y goat IgG (*Catalog number: AB-108-C, R&D systems, Biotechne*).

Ensayo de ligación por proximidad (PLA) en tejidos sanos y tumorales incluidos en parafina

El PLA es una poderosa herramienta que permite la detección y cuantificación *in situ* de proteínas endógenas, modificación de proteínas e interacción proteína a proteína con una alta especificidad y sensibilidad (35). Consiste en el uso de sondas correspondientes a oligonucleótidos que están conjugados a anticuerpos secundarios. Para evaluar la interacción proteína-proteína, se utilizan dos anticuerpos secundarios, dirigidos contra el anticuerpo primario de interés (en este caso anti CCR5 y anti Panexina 1), uno asociado a una sonda denominada *PLUS* y el otro asociado a la sonda *MINUS*. Las sondas hibridan si existe una cercanía entre ellas menor a 17 nm. La hibridación de las sondas lleva a la formación de un ADN circular, el cual es reconocido por una ADN polimerasa que amplifica la secuencia con el sistema de amplificación de círculo rodante (ACR). La reacción de amplificación localizada da como resultado un producto de ADN concatémico, que posteriormente será identificado con una sonda fluorescente (figura N°2). Este método de detección tiene como ventajas ser versátil, rápido, eficiente en la identificación de diferentes proteínas de acuerdo con el objetivo de estudio (35).

Para la realización del PLA indirecto en tejidos sanos y tumorales se siguió el protocolo de Duolink® PLA Fluorescence (36) y sus correspondientes modificaciones basándose en la literatura (37). Los cortes de tejidos fueron sometidos a recuperación antigénica en tampón EDTA a pH 8 utilizando una vaporera eléctrica durante 20 minutos. Se prosiguió con el bloqueo de la fluorescencia incubando los cortes con glicina 100 mM por 45 min. Posteriormente, se realizó el bloqueo antigénico utilizando Duolink® Blocking Solution en una cámara húmeda por 60 min a 37°C; lavados; incubación con anticuerpos primarios de isotipo IgG, correspondientes a policlonal de cabra anti CCR5 (*ab1673, Abcam, Cambridge, MA, USA*) y policlonal de conejo anti Panexina 1 (*ref: 710184, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific*) toda la noche a 4°C; dos lavados en Wash buffer A 1X a temperatura ambiente por 5 min c/u. Se realizó la incubación en cámara húmeda por 1 hr a 37°C

del anticuerpo secundario proveniente del *Duolink® In Situ Red Starter Kit Goat/Rabbit*, con sondas asociadas a anticuerpos secundarios anti cabra PLUS y anti conejo MINUS diluidas 1:5 en *Duolink® Antibody Diluent*; dos lavados en *Wash buffer A 1X* a temperatura ambiente por 5 min c/u; incubación con *Duolink® Ligation solution* en cámara húmeda por 30 min a 37°C; dos lavados en *Wash buffer A 1X* a temperatura ambiente por 5 min c/u; incubación con la solución de amplificación de *Duolink®* en una cámara húmeda por 100 min a 37°C, en todo momento protegiendo las láminas de la luz. Finalmente, se realizaron dos lavados con *Wash buffer B 1X* de 10 min c/u y un lavado con *Wash buffer B 0,01X* por 1 min, ambos a temperatura ambiente. Las placas fueron montadas con *Duolink® In Situ Mounting Medium con DAPI* y selladas con esmalte de uña transparente. Finalmente las láminas fueron visualizadas en microscopio confocal a un aumento de 40X y 60X (*C2+ confocal microscope, Nikon Instruments Inc, Melville, NY, USA*). Las láminas fueron almacenadas a 4°C.

Las técnicas de PLA fueron validadas realizando controles paralelos a la realización del experimento. Se realizaron controles técnicos omitiendo los anticuerpos primarios correspondientes, controles de isotipo utilizando isotipo rabbit (*ab171870, Abcam, Cambridge, MA, USA*) y goat IgG (*Catalog number: AB-108-C, R&D systems, Biotechne*), controles omitiendo el anticuerpo policlonal de conejo anti-Panexina-1 (*ref: 710184, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific*) e incluyendo el anticuerpo policlonal de cabra anti-CCR5 (*ab1673, Abcam, Cambridge, MA, USA*) y viceversa, se realizaron controles omitiendo el anticuerpo policlonal de cabra anti-CCR5 (*ab1673, Abcam, Cambridge, MA, USA*) e incluyendo el anticuerpo policlonal de conejo anti-Panexina-1 (*ref: 710184, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific*).

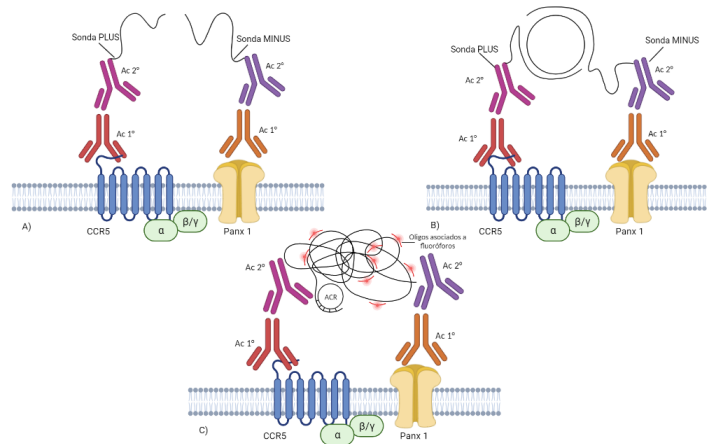


Figura N°2: Ensayo de ligación por proximidad (PLA). A) Anticuerpos primarios IgG policlona de cabra anti CCR5 y policlona IgG de conejo anti Panexina 1. Los anticuerpos primarios serán detectados de forma indirecta utilizando anticuerpos secundarios anti-cabra y anti-conejo, asociado a las sondas PLUS y MINUS respectivamente. B) Hibridación y ligación de sondas PLUS y MINUS conformándose el ADN circular. C) Amplificación del ADN circular a través del sistema de amplificación de círculo rodante (ACR). La sonda asociada a un fluoróforo se hibrida al ADN concatémico.

Procesamiento digital de imágenes

Las imágenes obtenidas fueron analizadas y cuantificadas utilizando la plataforma FIJI/Image J. Dado los resultados preliminares obtenidos por inmunohistoquímica (34), el procesamiento y análisis de imágenes para IFI dobles y PLA fue realizado exclusivamente en zonas de epitelios sanos y células tumorales, excluyendo aquellas zonas correspondientes al estroma.

Las imágenes arrojadas por las IFI doble en tejidos sanos y tumorales de colon fueron seteadas con respecto al control con omisión de anticuerpo primario y posteriormente fueron cuantificadas mediante la selección de dos áreas representativas o ROI (por sus siglas en inglés), utilizando la herramienta de medición para obtener el parámetro de densidad integrada representativa de la intensidad de la señal fluorescente.

Estas mismas imágenes fueron cuantificadas para el análisis de la colocalización entre las señales de CCR5 y Panexina 1. Se seleccionaron dos regiones de interés o ROI y fueron sometidas al algoritmo denominado “JACoP” del *software* FIJI/Image J, del cual se obtuvo el coeficiente de correlación de Pearson, los coeficientes de Manders y el coeficiente de correlación de fluorescencias (ICQ por sus siglas en inglés), más sus fluorogramas respectivos. El coeficiente de Pearson proporciona una aproximación de la amplitud que tiene la distribución de ambas señales con respecto a una recta. Su valor puede variar desde el -1 al 1, siendo 1 una correlación completa, -1 una correlación negativa y 0 ausencia de correlación (38). Los fluorogramas arrojados por el coeficiente de Pearson representan la intensidad de fluorescencia de los píxeles del canal verde (eje X) y la intensidad de fluorescencia de los píxeles del canal rojo (eje Y). De acuerdo a la correlación existente entre ambas señales se muestran diferentes nubes de puntos dispersos en torno a una ecuación de la recta (regresión lineal) que describe la relación existente entre ambas intensidades de la señal. Así, en una situación de colocalización total se observaría una nube de puntos distribuida estrechamente en torno a la recta (Figura N°3 A). En una situación de colocalización parcial se observará una nube de puntos distribuida fuera de los ejes y no estrechamente relacionada con la recta central (Figura N°3 C). Y, en una colocalización negativa la nube de puntos se distribuye en torno a sus ejes de forma independiente (Figura N°3 D). Hay situaciones en que se da una diferencia de intensidades entre ambos canales, provocando el desplazamiento de la recta (con el cambio de su pendiente) hacia el eje del canal que presenta la mayor intensidad (Figura N°3 B) (38).

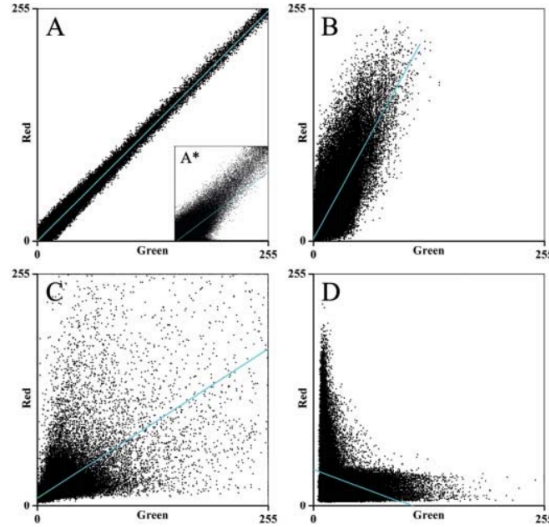


Figura N°3: Fluorograma representativo del coeficiente de Pearson, obtenidos mediante JACoP. Bolte.S et al. “A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy” [Review]; Francia; *Journal of Microscopy*; 26 Junio 2006 (38). A) Colocalización completa (Coeficiente Pearson= 1). B) Colocalización parcial, con diferentes intensidades entre ambos canales. En este caso la recta tiende a acercarse al eje del canal rojo. C) Colocalización parcial (coeficiente de Pearson < 1). D) Colocalización negativa (coeficiente de Pearson = -1). Dispersión de puntos hacia ambos ejes.

Por otro lado, el coeficiente de Manders otorga información con respecto al solapamiento de las señales y está basado en el coeficiente de Pearson. Se evalúa del 0 al 1, siendo el primero ausencia de solapamiento y el segundo 100% de colocalización entre ambas señales. M1 corresponde al porcentaje de píxeles que se solapan del canal 1 (verde) con respecto al canal 2 (rojo) y M2 corresponde al porcentaje de píxeles que se solapan del canal 2 (rojo) con respecto al canal 1 (verde)(38).

El coeficiente ICQ corresponde herramienta estadística basada en el uso de gráficos de dispersión (*scatter plot*) donde se comparan los valores de intensidad de los píxeles de cierto canal (A_i o B_i) versus el producto de las diferencias de las intensidades de los píxeles de cada canal con su media respectiva ($(A-a)(B-b)$). Estos gráficos resultantes enfatizan los píxeles de mayor intensidad y nos

permiten identificar pares de proteínas que varían ya sea en sincronía/dependiente ($0 < ICQ \leq +0,5$), al azar/mixto ($ICQ = \sim 0$) o segregada/independiente ($0 > ICQ \geq -0,5$) (Figura N°4) (38).

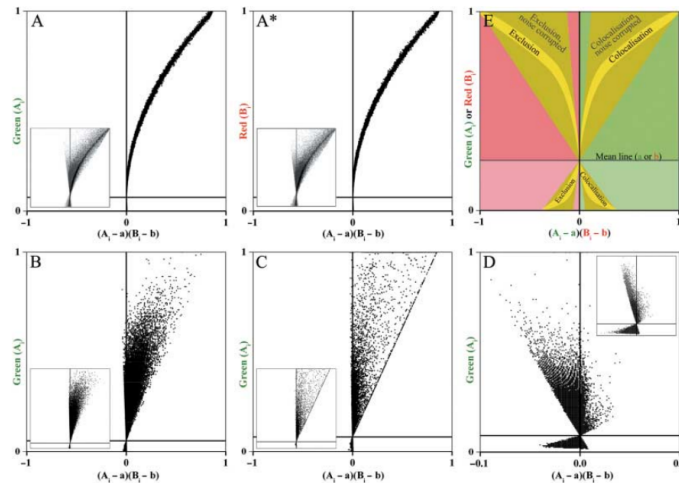


Figura N°4: Análisis de la correlación de intensidad (ICA), mediante JACoP. Bolte.S et al. “A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy” [Review]; Francia; Journal of Microscopy; 26 Junio 2006 (38). A) y A*) indican colocalización completa para los canales verde y rojo respectivamente. B) indica colocalización total pero con diferentes intensidades. C) Indica colocalización parcial y D) ausencia de colocalización o exclusión.

Finalmente, para la cuantificación de las señales obtenidas con la técnica de PLA se obtuvieron imágenes de 40X y 60X en el eje Z (con un total de planos entre 8 a 10 aproximadamente) con el fin de maximizar la captura de la señal PLA (Figura N°5). Estas imágenes se procesaron con tal de obtener la relación N° de señales PLA/Área y/o el N° de señales PLA/N° núcleos, a partir de dos regiones ROI definidas exclusivamente en zonas de epitelio sano y células tumorales. Lo anterior se logró estableciendo ROIs con una área de superficie similar y con el uso de un umbral automático (“Huang”) con tal de aleatorizar y evitar sesgos en el conteo de partículas. El conteo de partículas se realizó utilizando la herramienta “analyze particles”.

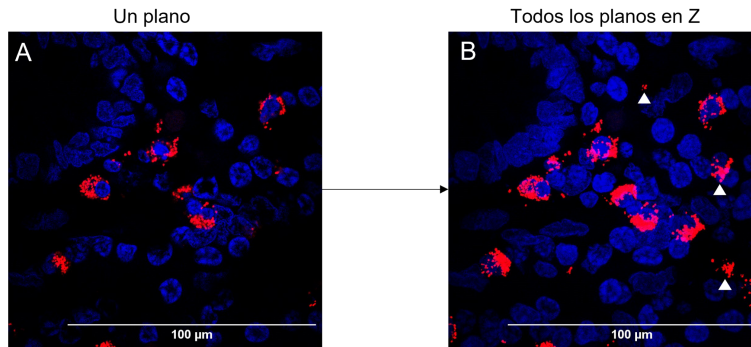


Figura N°5: Imagen representativa de la maximización de la señal PLA. A) Imagen capturada y procesada en un solo plano. B) Imagen capturada y procesada con todos los planos en el eje Z, se observa aparición de señales PLA en zonas que en la imagen de un solo plano no se distinguían. Ampliación 60X. Puntas de flechas indican señales PLA capturadas después de procesar todos los planos.

Análisis estadístico

Para determinar las diferencias de intensidad de señal en las IFI dobles y las diferencias en las marca asociadas a PLA en tejido sano o tumoral y en estadio I o III, se realizaron las pruebas estadísticas de t-test; la prueba de Mann-Whitney para datos no pareados y no paramétricos y el test Wilcoxon para datos pareados y no paramétricos, utilizando el programa GraphPad Software 9.0, considerando diferencias significativas con un valor de $p < 0,05$. Para los estudios de colocalización los resultados arrojados por la herramienta JACoP se validaron con el valor p en porcentaje, siendo 100% altas probabilidades de que exista colocalización.

Resultados

Inmunofluorescencia indirecta doble (IFI) de CCR5 y Panexina 1 en epitelio sano y células tumorales de pacientes con cáncer de colon

Con el objetivo de evaluar la presencia de las proteínas CCR5 y Panexina 1 en tejidos sanos y tumorales de colon, se seleccionaron 4 pacientes de acuerdo a su estadio tumoral (dos cuyo tumor correspondía a estadio temprano (I) y dos con estadio avanzado (III)) y que presentaban alto contenido de estas proteínas, respectivamente, según análisis de expresión relativa previos por inmunohistoquímica (34). Se identificó cada proteína mediante inmunofluorescencia indirecta doble y luego las señales se cuantificaron seleccionando zonas representativas de la muestra. Se evaluaron exclusivamente zonas que incluyeran epitelio sano y células tumorales, como se representa en la figura N°6. En la muestra 2.12.15 (correspondiente a estadio I). El epitelio sano presentó escasa inmunotinción para CCR5 y Panexina 1 (Figura N°6 A y B), viéndose escasa superposición de marcas (Figura N°6 C). Por el contrario, las células tumorales presentan mayor inmunotinción de patrón citoplasmático y de membrana para ambas proteínas (Figura N°6 D y E), viéndose mayor superposición de marcas (Figura N°6 F). Por otro lado, en la muestra CE211 (correspondiente al estadio III), se observó que el epitelio sano presenta escasa inmunotinción para CCR5 y Panexina 1 (Figura N°6 G y H), sin embargo presenta mayor intensidad que en el epitelio sano observado en la figura N° 6 A, con mayor superposición de marcas (Figura N°6 I). Finalmente, al analizar las células tumorales, se observó que presentaban una inmunotinción con patrón citoplasmático y de membrana muy intensa (Figura N°6 J y K), viéndose alta superposición de las marcas (Figura N°6 L). Para la muestra CE222 (correspondiente a estadio III) (Anexo N°1 C y D) se observaron resultados similares a los mencionados anteriormente, sin embargo para muestra CE210 (correspondiente a estadio I) se observó mayor inmunotinción en

epitelios sanos con respecto a células tumorales, en estas últimas no se observó inmunotinción (Anexo N°1 A y B).

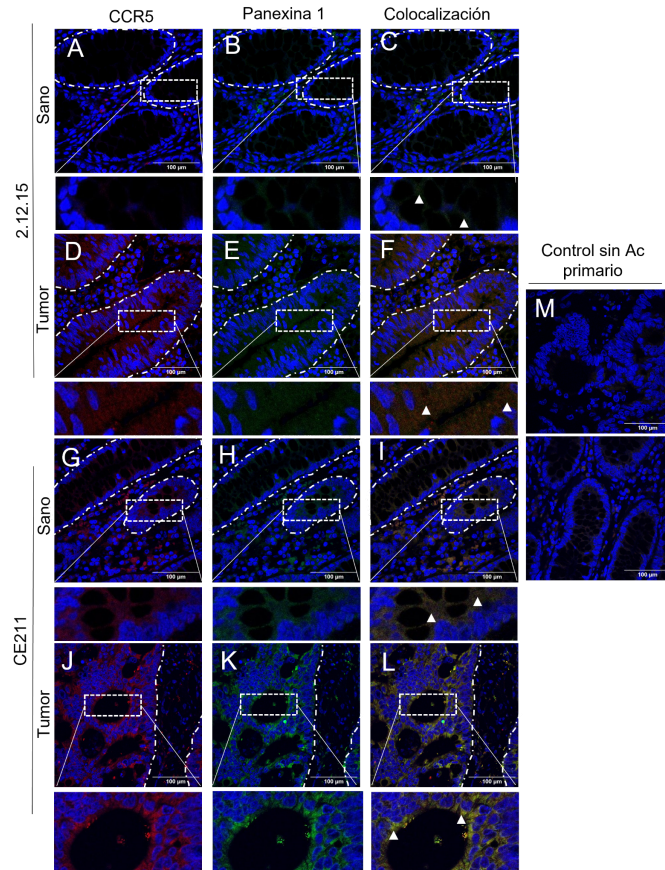


Figura N°6: Imagen representativa de inmunofluorescencia indirecta doble de CCR5 y Panexina 1 en tejidos sanos y tumorales de pacientes con cáncer de colon. A), B) Epitelio sano presenta inmunotinción positiva para CCR5 y Panexina 1 en muestra 2.12.15 (estadio I) C) Superposición de marcas (amarillo). D) y E) Células tumorales con inmunotinción positiva para CCR5 y Panexina 1 de patrón citoplasmático y de membrana en muestra 2.12.15. F) Superposición de marcas (amarillo). G) y H) Epitelio sano presenta inmunotinción positiva para CCR5 y Panexina 1 en muestra CE211 (estadio III). I) Superposición de marcas (amarillo). J) y K) Células tumorales con inmunotinción positiva para CCR5 y Panexina 1 de patrón citoplasmático y de membrana en muestra CE211. L) Superposición de marcas (amarillo). M) Control sin anticuerpos primarios. Ampliación 40X. Líneas punteadas delimitan el epitelio sano y las células tumorales. Puntas de flechas indican la colocalización en color amarillo entre CCR5 y Panexina 1. Cuadrados representan zona ampliificada.

Para cada muestra se cuantificó la marca de CCR5 en dos ROI (Tabla N°2). Esta cuantificación arrojó un aumento significativo ($p= 0,0078$) (Figura N°7 A) en los niveles de expresión relativa de CCR5 en células tumorales en comparación a epitelio sano. Sin embargo, al comparar los niveles de expresión en células tumorales, entre estadios tempranos (I) y avanzados (III), no se observaron diferencias significativas ($p= 0,3429$) (Figura N°7 B).

Tabla N°2: Valores de la densidad integrada (expresión relativa) de CCR5 y Panexina 1 de tejidos sanos y tumorales de pacientes con cáncer de colon.

Muestra	Estadio	Epitelio sano		Células tumorales	
		CCR5	Panexina 1	CCR5	Panexina 1
CE210	I	22415662,95	65664076,59	34863027,15	26026748,88
		10018859,43	35629285,65	41330562,86	32247034,49
2.12.15	I	18074086,03	39300266,69	135133881,3	90658396,53
		15074248,35	41974598,01	127069688,9	87913590,63
CE222	III	1893698,299	30991998,38	8573990,77	72294890,69
		3388163,878	57514145,42	10404639,11	86901464,46
CE211	III	51005422,04	43034311,21	81183778,94	35070903,89
		6152337,234	51068328,13	90911497,18	48185290,95

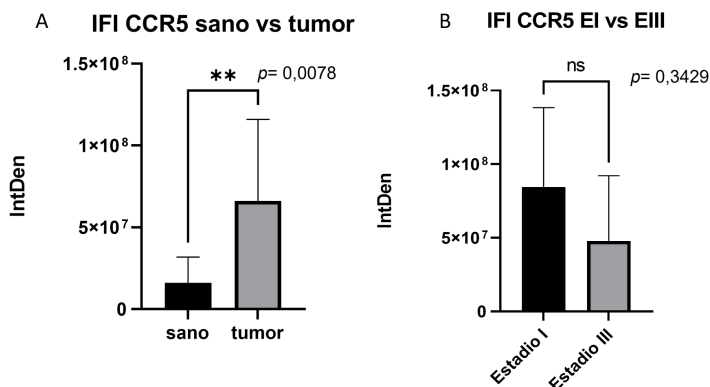


Figura N°7: Expresión relativa de CCR5 mediante IFI doble entre tejidos sanos y tumorales o entre estadio I y III. A) Comparación de la expresión relativa de CCR5 entre tejidos sanos y tejidos tumorales. Los niveles de expresión relativa fueron más altos en células tumorales en relación a las células del epitelio sano ($p= 0,0078$). B) Comparación de la expresión relativa de CCR5 entre muestras de tejido tumoral de estadio I y III, no existe diferencia entre ambos ($p= 0,3429$). Los análisis estadísticos utilizados fueron el test Wilcoxon para datos pareados y no paramétricos (sano vs tumor) y el test de Mann-Whitney para datos no pareados y no paramétricos (estadio I vs estadio III). Se consideraron $p < 0,05$ estadísticamente significativos.

Por otro lado, para cada muestra se cuantificó la marca de Panexina 1 (Tabla N°2). Los resultados obtenidos para Panexina 1 se muestran en los gráficos de la figura N°8, donde al comparar los niveles de expresión relativa entre epitelio sano y células tumorales no se obtuvieron diferencias significativas ($p=0,3828$) (Figura N°8 A). De forma similar, al comparar los niveles de expresión relativa entre aquellos tumores de estadio I y III no se observaron diferencias significativas ($p > 0,9999$) (Figura N°8 B).

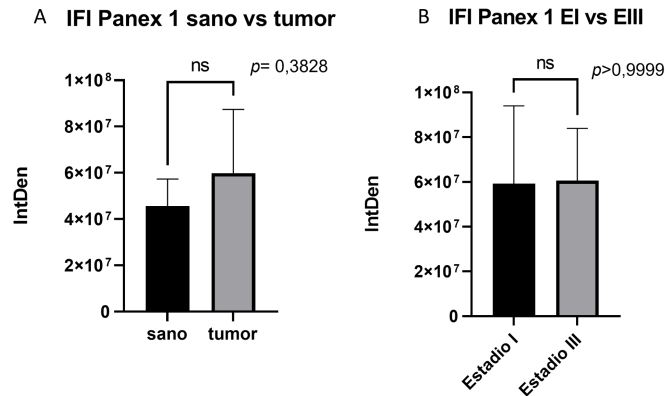


Figura N°8: Expresión relativa de Panexina 1 mediante IFI doble entre tejidos sanos y tumorales o de estadio I y III. A) Comparación de la expresión de Panexina 1 entre tejido sano y tejido tumoral. Los niveles de expresión relativa no presentaron diferencias significativas entre el epitelio sano y las células tumorales ($p=0,3828$). B) Comparación de la expresión relativa de Panexina 1 entre tejidos tumorales de estadio I y III, no se observa diferencia significativa en los niveles de expresión de ambas condiciones ($p>0,9999$). Los análisis estadísticos utilizados fueron, el test Wilcoxon para datos pareados y no paramétricos (sano vs tumor) y el test de Mann-Whitney para datos no pareados y no paramétricos (estadio I vs estadio III). Se consideraron $p<0,05$ estadísticamente significativos.

Análisis de colocalización de CCR5 y Panexina 1 a través de inmunofluorescencia indirecta doble en tejidos sanos y tumorales de pacientes con cáncer de colon

De las imágenes obtenidas mediante IFI dobles, se analizaron los tejidos sanos y tumorales, seleccionando exclusivamente las células epiteliales sanas y células tumorales según correspondía el caso, como se muestra en la figura N°6. Como se mencionó anteriormente, de cada muestra se seleccionaron dos regiones de interés (ROI). Al analizar superposición de marcas, no es posible cuantificar y evaluar objetivamente la colocalización de las señales en los diferentes tejidos. Así, para la cuantificación de la colocalización entre las señales fluorescentes emitidas de CCR5 y Panexina 1, se realizó un análisis basado en la correlación entre las intensidades de los píxeles arrojados por las imágenes, con la obtención del coeficiente de correlación (R-pearson), el coeficiente de solapamiento (coeficiente de Manders) y el análisis de la correlación entre

fluorescencias (ICA en sus siglas en inglés), obteniendo el coeficiente de correlación de intensidad (ICQ) (Tabla N°3). Los valores arrojaron fluorogramas y gráficos de dispersión cuya distribución de puntos demostró colocalización parcial en todos los tejidos (Figura N°9 y N°10) (Anexo N°2 y N°3). Todos los resultados arrojaron un valor p del 100%, sugiriendo que la colocalización observada en las imágenes es altamente probable.

Tabla N°3: Valores de los coeficientes de correlación (R-pearson), Coeficiente de Manders (M) y coeficiente de correlación de intensidad (ICQ) de tejidos sanos (S) y tumorales (T) en pacientes con cáncer de colon. Valor $p=100\%$.

Muestra	ROI	R-Pearson	M1	M2	ICQ
CE210 S	ROI 1	0,77	0,558	0,558	0,41676617
	ROI 2	0,757	0,512	0,672	0,43997955
CE210 T	ROI 1	0,814	0,52	0,542	0,48159027
	ROI 2	0,793	0,563	0,576	0,46503544
2.12.15 S	ROI 1	0,477	0,161	0,788	0,37159061
	ROI 2	0,528	0,188	0,788	0,41909981
2.12.15 T	ROI 1	0,698	0,399	0,493	0,45931053
	ROI 2	0,696	0,397	0,488	0,45609283
CE222 S	ROI 1	0,487	0,213	0,524	0,41971016
	ROI 2	0,529	0,243	0,542	0,41081238
CE222 T	ROI 1	0,605	0,325	0,437	0,43215942
	ROI 2	0,607	0,331	0,447	0,44234371
CE211 S	ROI 1	0,861	0,607	0,663	0,49230289
	ROI 2	0,815	0,606	0,717	0,45044518
CE211 T	ROI 1	0,813	0,631	0,64	0,45219803
	ROI 2	0,822	0,64	0,641	0,44444275

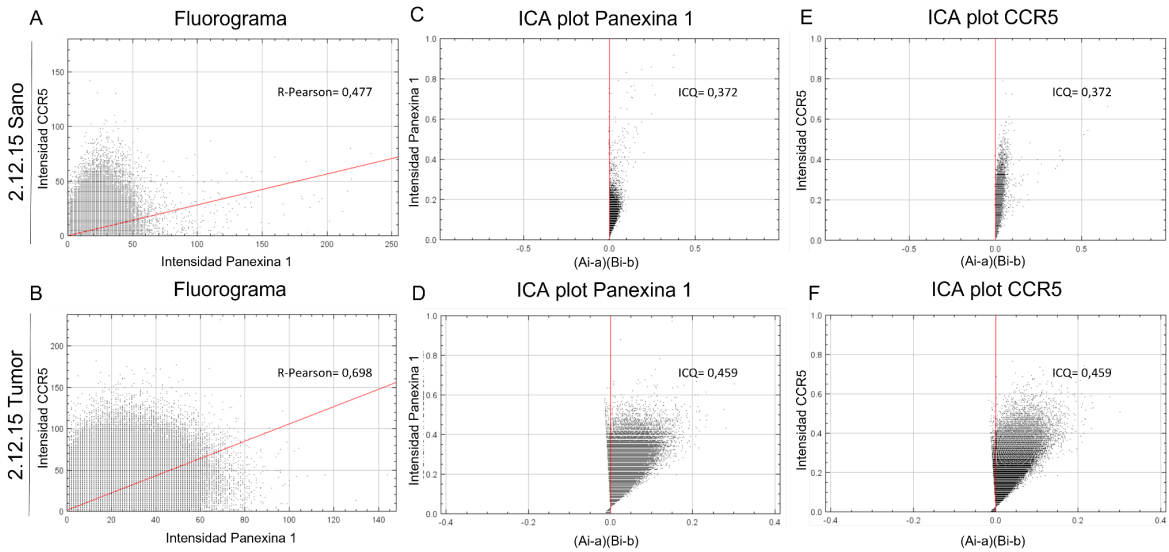


Figura N°9: Resultados análisis de colocalización en la muestra 2.12.15 (ROI 1). A) y B) Fluorogramas para el tejido sano y tumoral, que representa la distribución de los píxeles para los canales verde (Panexina 1) en X y rojo (CCR5) en Y, observándose una colocalización parcial positiva con un $R\text{-Pearson} = 0,477$ y $R\text{-pearson} = 0,698$ respectivamente. C), D), E) y F) Gráficos de análisis de correlación de la fluorescencia (ICA) en tejido sano y tumoral. En Y se observa la intensidad de la fluorescencia para Panexina 1 o CCR5 versus en X correspondientes a los valores calculados $(A_i - a)/(B_i - b)$. En tejidos sanos se obtuvo un coeficiente de correlación de la fluorescencia positivo $ICQ = 0,372$. En tejidos tumorales se obtuvo un coeficiente de correlación de la fluorescencia positivo $ICQ = 0,459$. A_i y B_i corresponden a las intensidades de fluorescencia individuales. a y b corresponden a la media de la distribución de N valores para A_i y B_i respectivamente.

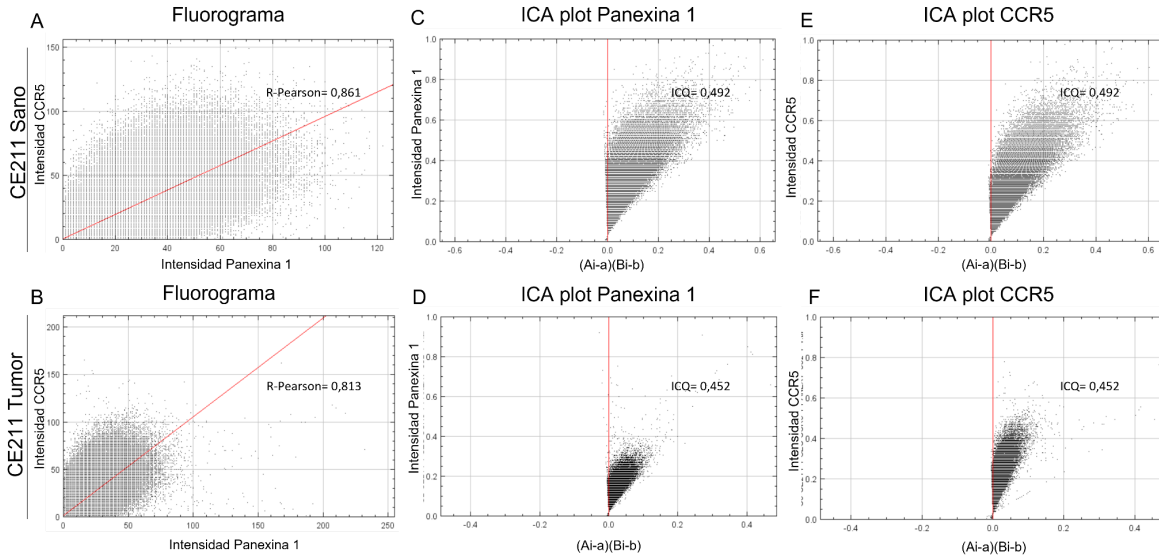


Figura N°10: Resultados del análisis de colocación en la muestra CE211 (ROI 1). A) y B) Fluorogramas para el tejido sano y el tejido tumoral, que representa la distribución de los píxeles para los canales verde (Panexina 1) en X y rojo (CCR5) en Y, observándose una colocación parcial positiva con un R-Pearson= 0,861 y R-pearson= 0,813 respectivamente. C), D), E) y F) Gráficos de análisis de correlación de la fluorescencia (ICA). En Y se observa la intensidad de la fluorescencia para Panexina 1 Y CCR5 versus en X correspondientes a los valores calculados $(A_i - a)(B_i - b)$. En tejidos sanos se obtuvo un coeficiente de correlación de la fluorescencia positivo $ICQ = 0,492$. En tejidos tumorales se obtuvo un coeficiente de correlación de la fluorescencia positivo $ICQ = 0,452$. A_i y B_i corresponden a las intensidades de fluorescencia individuales. a y b corresponden a la media de la distribución de N valores para A_i y B_i respectivamente.

Análisis de la interacción entre CCR5 y Panexina 1 mediante ensayo de ligación por proximidad en tejidos sanos y tumorales de pacientes con cáncer de colon

A partir de los tejidos sanos y tumorales destinados al ensayo de ligación por proximidad (PLA), se obtuvieron imágenes en el eje Z a un aumento de 40X y 60X. Como se mencionó anteriormente, la cuantificación de las señales fue realizada exclusivamente en aquellas zonas correspondientes al epitelio sano y a las células tumorales (Figura N°11) (Anexo N°4). Este análisis permitió identificar marcas de tinción roja, que sugieren la cercanía entre ambas moléculas (Figura N°11 y Anexo N°4).

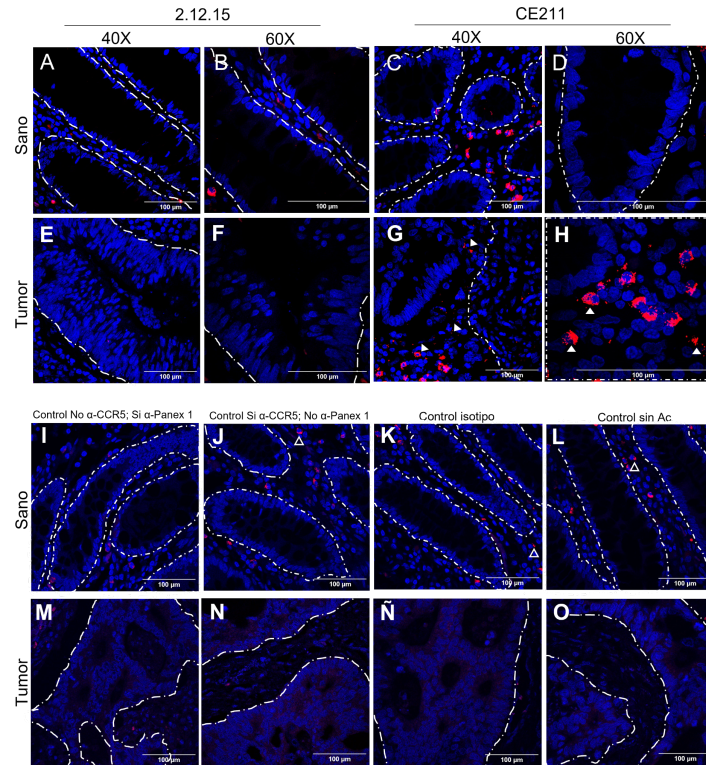


Figura N°11: Imagen representativa de ensayo de ligación por proximidad en tejidos sanos y tumorales de pacientes con cáncer de colon. A) y B) Tejido epitelial sano del paciente 2.12.15 (estadio I). Se observa tejido con escasa señal de PLA en las células epiteliales. E) y F) Tejido tumoral del paciente 2.12.15. Tejido presenta escasa señal de PLA en células tumorales. C) y D) Tejido epitelial sano del paciente CE211 (estadio III). Se observa escasa señal de PLA en células epiteliales. G) y H) Tejido Tumoral del paciente CE211. Se observan intensas señales fluorescentes de PLA rodeando a las células tumorales. I) al O) Controles técnicos. I) y M) Control omitiendo anticuerpo anti-CCR5, si agregando el anticuerpo anti-Panexina 1. J) y N) Control omitiendo anticuerpo anti-Panexina 1, si agregando el anticuerpo anti-CCR5. K) y Ñ) Control de isotipo, reemplazando los anticuerpos primarios por isotipos irrelevantes. L) y O) Control con omisión de ambos anticuerpos primarios. Cabe destacar, que en lámina propia de los controles sanos (I-L) se observa señal fluorescente indicada por el contorno de las puntas de flechas. Las señales PLA se indican con puntas de flechas en color blanco. Ampliación 40X y 60X.

Los datos obtenidos se clasificaron de acuerdo al número de señales PLA/el área de la región seleccionada y de acuerdo al número de señales PLA/el número de núcleos de la región seleccionada. Estos parámetros posteriormente fueron comparados de acuerdo a las condiciones de tejido sano y tumoral (Figura N°12) o estadio I y estadio III (Figura N°13). Al comparar los datos obtenidos entre la relación número de señales PLA/ número de núcleos de la región seleccionada en 40X o 60X y los tejidos sanos versus los tejidos tumorales, no se observaron diferencias significativas ($p= 0,1484$ en imágenes 40X y $p>0,9999$ en imágenes 60X) (Figura N°12 A y B). De manera similar, al comparar los datos obtenidos entre la relación número de señales PLA/ área de la región seleccionada en 40X o 60X y los tejidos sanos versus los tejidos tumorales, tampoco se observaron diferencias significativas ($p= 0,0547$ en imágenes 40X y $p= 0,1484$ en imágenes 60X), sin embargo sí se observó una tendencia (promedio \pm desviación estándar) mayor en la relación número de señales PLA/ área de la región seleccionada en las muestras de tejidos tumorales (($0,1582 \pm 0,2026$) en 40X con respecto a los tejidos sanos (($0,03402 \pm 0,03436$) en 40X (figura N°12 C y D).

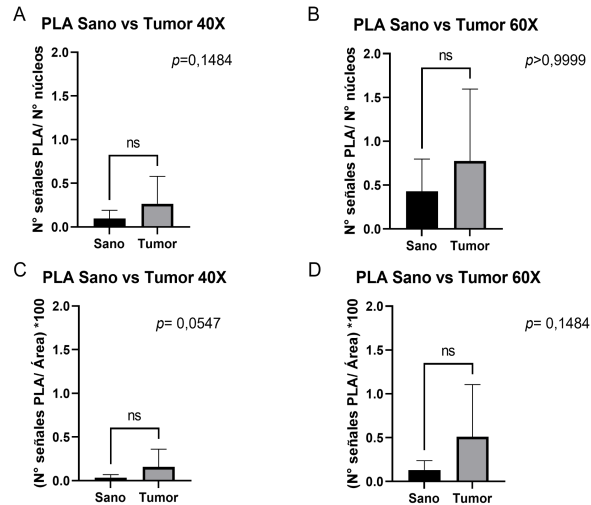


Figura N°12: Relación N°señales PLA/N° núcleos o N° señales PLA/área en tejidos sanos y tumorales. A) y B) Valores de la relación N° señales PLA/ N° núcleos entre tejidos sanos y tumorales. No se observa una diferencia significativa ($p=0,1484$ en 40X; $p>0,9999$ en 60X). C) y D) Valores de la relación N° señales PLA/ Área entre tejidos sanos y tumorales. No se observa diferencia significativa ($p=0,0547$ en 40X; $p=0,1484$ en 60X), sin embargo, en tejidos tumorales existe la tendencia a presentar mayores valores a 40X con respecto a los tejidos sanos a 40X. Nótese que la fórmula de N° partículas/ Área fue multiplicada por 100 solo con el propósito de trabajar todos los valores en la misma notación científica. El análisis estadístico utilizado fue el test Wilcoxon para datos pareados y no paramétricos. Se consideraron $p<0,05$ estadísticamente significativos.

Por otro lado, al comparar los datos entre la relación N° señales PLA/ N° de núcleos de la región seleccionada en 40X o 60X y los tejidos tumorales de estadio temprano (I) o de estadio avanzado (III), se observaron diferencias significativas ($p=0,0286$ para 40X y 60X), existiendo una mayor señal de PLA en aquellos tejidos tumorales (($0,4953 \pm 0,2983$) en 40X y ($1,384 \pm 0,7577$) en 60X) con respecto a los tejidos sanos (($0,03768 \pm 0,02398$) en 40X y ($0,1634 \pm 0,09704$) en 60X) (Figura N°13 A y B). Resultados similares se obtuvieron al comparar los datos entre la relación N° señales PLA/ Área de la región seleccionada en 40X y 60X y tejidos tumorales de estadio temprano (I) o de estadio avanzado (III), donde se observaron diferencias significativas ($p=0,0286$ para 40X y 60X),

existiendo una mayor señal de PLA en aquellos tejidos tumorales ((2,940 ± 2,153) en 40X y (9,129 ± 6,207) en 60X) con respecto a los tejidos sanos ((0,2242 ± 0,1358) en 40X y (1,088 ± 0,9150) en 60X) (figura N°13 C y D).

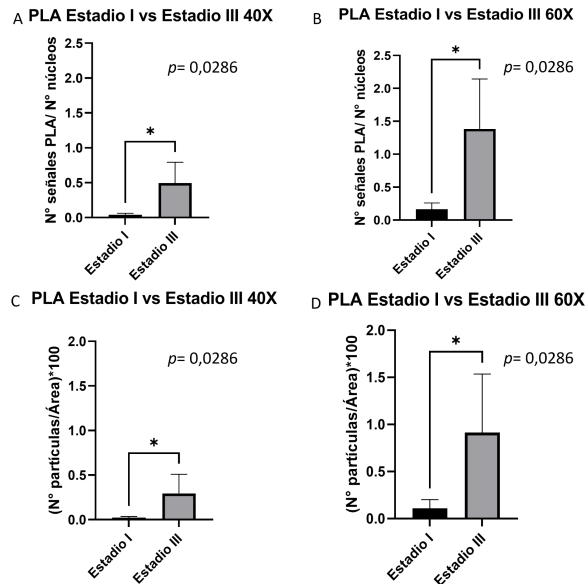


Figura N°13: Relación N° señales PLA/ N° núcleos o N° señales PLA/ Área en tejidos tumorales de estadio temprano (I) o estadios avanzados (III). A) y B) Valores de la relación N°señales PLA/N° núcleos entre los tejidos tumorales de estadio temprano (I) y estadios avanzados (III). Se observan diferencias significativas ($p= 0,0286$ para 40X y 60X). C) y D) Valores de la relación N° señales PLA/Área entre los tejidos tumorales de estadio temprano (I) y estadios avanzados (III). Se observan diferencias significativas ($p= 0,0286$ para 40X y 60X). Nótese que la fórmula de N° partículas/ Área fue multiplicada por 100 solo con el propósito de trabajar todos los valores en la misma notación científica. El análisis estadístico utilizado fue el test de Mann-Whitney para datos no pareados y no paramétricos. Se consideraron $p<0,05$ estadísticamente significativos.

Discusión

El presente estudio tuvo como principal objetivo evaluar la interacción proteína-proteína entre CCR5 y Panexina 1 en tejidos sanos y tumorales de pacientes con cáncer de colon. Considerando los antecedentes que demuestran la relación entre ambas proteínas en etapas tempranas de la infección por el virus VIH (39), surgió la necesidad de analizar esta interacción, la cual no ha sido explorada en el contexto de cáncer de colon. Nuestros resultados por IFI dobles demuestran un aumento significativo en los niveles de expresión de CCR5 en los tejidos tumorales, concordando con los resultados preliminares obtenidos por análisis de inmunohistoquímica (34) y con otros estudios que han demostrado un aumento de CCR5 en cáncer de colon (27). Sin embargo, los resultados obtenidos para Panexina 1 no arrojaron diferencias significativas entre los tejidos tumorales y sanos, discrepando con lo identificado previamente en las inmunohistoquímicas (34), diferencias que pueden estar explicadas por el bajo n muestral utilizado en este estudio, al utilizarse muestras en etapa temprana (n=2) y avanzada (n=2). Además, hemos visto que las muestras en etapa temprana expresan bajos niveles de Panexina 1 (34), por lo tanto las diferencias de expresión tumoral entre etapas tempranas y tardías podrían estar aumentando la dispersión de los datos, influyendo en el análisis estadístico.

El análisis de expresión de CCR5 y Panexina 1 mediante IFI doble, nos dio el primer acercamiento de la distribución espacial en la que se encontraban ambas proteínas. La superposición de señales entre CCR5 y Panexina 1 sugieren como primer análisis la expresión de estas moléculas en células tumorales principalmente. Sin embargo, es difícil extrapolar esta información como una medida de colocalización, ya que la superposición de señales también depende directamente de las intensidades de fluorescencia de cada imagen (40,41). Dado lo anterior, el análisis cuantitativo de la colocalización, mediante la obtención de los coeficientes de Pearson, ICQ y Manders, sugieren que en todas las muestras existe una colocalización parcial positiva, independiente de los niveles

de expresión de CCR5 y Panexina 1. Esto podría estar respaldando los resultados obtenidos en un estudio realizado previamente en nuestro laboratorio, donde se demostró la existencia de una correlación positiva entre la expresión de CCR5 y Panexina 1 en células tumorales de cáncer de colon mediante inmunohistoquímica (34).

Por otro lado, el análisis de la interacción entre CCR5 y Panexina 1 mediante PLA, resulta ser una técnica muy interesante para evaluar la interacción de moléculas en el contexto de un tejido complejo como lo es un tumor. Mediante esta técnica logramos identificar marcas fluorescentes en epitelio y células tumorales de las muestras analizadas, lo que sugiere que CCR5 y Panexina 1 estarían lo suficientemente cercanas como para que los anticuerpos y sondas utilizadas para la técnica de PLA permitan la amplificación de un fragmento de DNA y posterior identificación de estos amplicones. Sin bien, al comparar las señales obtenidas entre tejidos sanos y tumorales no se obtuvieron diferencias significativas, si hubieron tendencias a verse en mayor cantidad en células de tejidos tumorales de ciertas muestras, pero el bajo n muestral nuevamente fue una limitante para sacar mayores conclusiones. En cambio, al comparar las señales arrojadas por las células de tejidos tumorales, se observó que en aquellas de estadios avanzados (III) las señales de PLA aumentaban significativamente con respecto a estadios tempranos (I), es decir, existe un aumento en la interacción proteína-proteína entre CCR5 y Panexina 1 en estos tejidos. Lo anterior, sugiere fuertemente que el aumento de esta interacción está directamente relacionada con los estadios tumorales más avanzados.

A pesar de haber obtenido resultados muy alentadores, aún quedan muchos detalles por afinar. Nuestros controles técnicos presentaron zonas del estroma donde se observaba una señal fluorescente puntiforme muy similar a la señal del PLA. De lo anterior, se sugiere que estas señales observadas pueden estar dadas por algún componente autofluorescente propio del mismo tejido colónico (42). Hay varios estudios que indican la presencia de autofluorescencia en los tejidos

colónicos sanos y de adenocarcinomas. Por ejemplo, un estudio realizado en tejidos de colon sanos, expuestos a diferentes longitudes de onda bajo un microscopio de fluorescencia confocal, demostró que existe entre los espectros de emisión de 550nm a 650nm, una autofluorescencia granular ubicada en la lámina propia, muy similar a la encontrada en nuestro caso. Esta fluorescencia fue atribuida a la presencia ya sea de eosinófilos, macrófagos conteniendo pigmentos como son la lipofuscina o restos celulares (43). Otro estudio similar, realizado a longitudes de emisión de aproximadamente entre 540- 635 nm, demostró que en la lámina propia de adenocarcinomas se observaban patrones de autofluorescencia asociadas a porfirinas endógenas (posiblemente aumentadas por el cambio metabólico inducido del mismo cáncer) o a la hemoglobina presente en los glóbulos rojos propios del cáncer (44). Ahora bien, en nuestro caso se analizaron exclusivamente aquellas zonas del tejido correspondientes a epitelio sano o células tumorales, dejando de lado aquellas regiones del estroma, por lo que la obtención de los resultados no se vio sesgada por esta señal fluorescente vista en los controles. Sin embargo, en un futuro, el estroma podría ser un factor importante de estudio. El análisis del ambiente tumoral podría otorgar información importante de la dinámica detrás de esta interacción; considerando que ya se ha demostrado previamente que en tejidos de cáncer colorrectal existe una relación entre el ambiente protumoral y el receptor CCR5 (13). Dado lo anterior, se propone a futuro incorporar en los protocolos de PLA una etapa adicional dirigida al bloqueo de autofluorescencia en el que se utilice una solución de Sudan Black B 0.1% en etanol de 70% para evitar cualquier señal adicional al PLA (45).

Por otro lado, aunque el PLA es una técnica altamente sensible y específica que permite detectar, visualizar y cuantificar la interacción proteína-proteína en tejidos, requiere de una o más técnicas para respaldar los resultados obtenidos de esta interacción. La coimmunoprecipitación (co-IP) es una técnica que sería útil para el análisis de las interacciones proteína-proteína, corresponde a una

técnica semicuantitativa que demuestra la interacción mediante bandas en un gel (46). La co-IP de proteínas, a partir de fracciones celulares o lisados de tejidos, es una técnica que aporta evidencia convincente de que dos o más proteínas interactúan físicamente (47). Normalmente, un anticuerpo específico para una proteína se incuba con una mezcla de proteínas para formar un complejo inmunitario con la proteína de interés. Esta proteína en cuestión podría estar interactuando con una o más proteínas en un complejo, en nuestro caso CCR5 interactuando con Panexina 1. Después de unirse a los anticuerpos, el complejo completo se puede aislar de la mezcla usando proteína A o proteína G inmovilizada y visualizarlo mediante geles de Western-blot (48).

Sabemos que las proteínas juegan un rol fundamental en las funciones celulares y que forman complejas redes de interacciones con otras proteínas, lo que da como resultado sistemas celulares dinámicos altamente organizados (49). Sin embargo, la disfunción en algunas de estas interacciones pueden conllevar a la generación de patologías como son el cáncer (49). Muchos estudios han demostrado la importancia de las interacciones proteicas en el inicio y desarrollo del cáncer. Un ejemplo de ello, fue el descubrimiento de la interacción favorecida por el desequilibrio de la vía canónica Wnt- β -catenina, dada por la pérdida de APC y la acumulación de β -catenina. El aumento de β -catenina (que depende de APC), induce una interacción con proteínas de unión al ADN de la familia Tcf/Lef, que favorecen la actividad transcripcional en células colónicas y en consecuencia la transformación maligna con el inicio del cáncer colorrectal esporádico (50).

Aún queda por dilucidar el mecanismo molecular que hay detrás de esta interacción. Si bien, este estudio sugiere que existe un aumento en la interacción proteína-proteína entre CCR5 y Panexina 1 en células tumorales de cáncer de colon de estadios avanzados (III); también, los resultados de colocalización podrían estar sugiriendo que estas proteínas estarían formando parte de un mismo complejo proteico. Lo anterior, nos permite insinuar que la interacción entre ambas proteínas podría estar favoreciendo la carcinogénesis en alguna etapa del proceso oncogénico de las mismas

células tumorales del cáncer de colon. Se sabe que en el contexto por VIH, la activación de CCR5 puede inducir la apertura de Panexina 1, con la consiguiente liberación de ATP (39). Además, antecedentes que muestran el aumento de quimioquinas (CCL2, CCL3 y CCL4) en el microambiente tumoral de tejidos con cáncer de colon (22), nos permiten sugerir que el mecanismo molecular que conlleva esta interacción sea probablemente mediado por la activación inicial de CCR5, que posteriormente, a través de mecanismos similares a los visto en linfocitos T CD4+, lleven a la apertura del hemicanal Panexina 1 con la respectiva liberación de ATP. Se ha visto que este último, es uno de los componentes principales del microambiente tumoral, el cual participa de la proliferación, motilidad y diseminación de las células cancerosas, ayudando así posiblemente a la progresión del cáncer (30). Considerando lo anterior, sería interesante en un futuro, realizar estudios *in vivo* con líneas celulares de cáncer de colon, en donde se realicen ensayos en tiempo real que nos permitan evaluar la dinámica de esta interacción. La estimulación o inhibición de las células con agonistas (como son las quimioquinas CCL2, CCL3 o CCL4) y antagonistas (fármacos como el Maraviroc (51)) de CCR5 respectivamente, podrían aportar valiosa información sobre el dinamismo detrás de esta interacción.

Finalmente, la interacción encontrada entre CCR5 y Panexina 1 en etapas avanzadas de cáncer de colon otorga nuevos antecedentes que podrían sugerir a estas moléculas como posibles objetivos terapéuticos en cáncer de colon de etapas avanzadas. Fármacos antagonistas de CCR5, como son el Maraviroc (51) o inhibidores de Panexina 1 como son Probenecid y Carbenoxolone (28), podrían implementarse como potenciales tratamientos dirigidos a la inhibición de esta interacción y por consiguiente detener la progresión del cáncer de colon en etapas avanzadas.

Conclusión

En el presente estudio, pudimos corroborar que los niveles de expresión de CCR5 se encontraban aumentados en tejidos tumorales con respecto a los tejidos sano de colon, al igual como fue determinado en estudios preliminares por inmunohistoquímica. Además, el análisis de la interacción proteína-proteína entre CCR5 y Panexina 1 nos permitió sugerir que ésta se encuentra aumentada en tejidos tumorales, especialmente en aquellos tejidos con estadios avanzados (III). Sumado a lo anterior, este trabajo muestra los primeros antecedentes en relación a la interacción entre CCR5 y Panexina 1 en tejidos sanos y tumorales de colon. Sería interesante dilucidar el mecanismo molecular que hay detrás de este proceso, cómo podría estar relacionado con otros elementos del microambiente tumoral y su rol en los procesos de progresión del cáncer de colon. Sabemos que este es una enfermedad que afecta a miles de personas en todo el mundo y su alta mortalidad la hace un problema de salud pública. Por lo mismo, el estudio a profundidad de la interacción entre CCR5 y Panexina 1, podría aportar información valiosa para comprender el origen de esta enfermedad e incluso contribuir al desarrollo de terapias farmacológicas dirigidas a esta interacción, que permitan detener la progresión del cáncer de colon.

Bibliografía

1. Descripción y Epidemiología - DIPRECE [Internet]. Disponible en: <https://diprece.minsal.cl/garantias-explicitas-en-salud-auge-o-ges/guias-de-practica-clinica/cancer-colorectal-en-personas-de-15-anos-y-mas/descripcion-y-epidemiologia/>
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018 Nov; 68(6):394–424.
3. Wolf AMD, Fontham ETH, Church TR, Flowers CR, Guerra CE, LaMonte SJ, et al. Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018 Jul; 68(4):250–81.
4. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterology Review/Przegląd Gastroenterologiczny* [Internet]. 2019 ;14(2):89–103. Disponible en: <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>
5. Pilleron S, Sarfati D, Janssen-Heijnen M, Vignat J, Ferlay J, Bray F, et al. Global cancer incidence in older adults, 2012 and 2035: A population-based study. *International Journal of Cancer* [Internet]. 2019 Jan 1;144(1):49–58. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.31664>
6. Álvarez K, de La Fuente M, López-Köstner F. Carcinogénesis colorrectal.
7. Pathology Outlines Adenocarcinoma [Internet]. Disponible en: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/colontumoradenocarcinoma.html>
8. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology* [Internet]. 2012 ;3(3):153. Disponible en: </pmc/articles/PMC3418538/>
9. Recio-Boiles A, Cagir B. Colon Cancer [Internet]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470380/>
10. Etapas del cáncer colorrectal [Internet]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/deteccion-diagnostico-clasificacion-po-r-etapas/clasificacion-de-la-etapa.html>
11. Landskron G, de La Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *Journal of Immunology Research*. 2014;2014.
12. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* [Internet]. 2010 Mar 19;140(6):883–99. Disponible en: <http://www.cell.com/article/S0092867410000607/fulltext>
13. Erreni M, Bianchi P, Laghi L, Mirolò M, Fabbri M, Locati M, et al. Chapter 5 Expression of Chemokines and Chemokine Receptors in Human Colon Cancer. Vol. 460, *Methods in Enzymology*. 2009. p. 105–21.

14. Zamarron BF, Chen W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *International Journal of Biological Sciences*. 2011;7(5):651–8.
15. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *European Journal of Pharmacology*. 2020 Jun 15;877:173090.
16. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* (1979) [Internet]. 2006 Sep 29;313(5795):1960–4. Disponible en: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1129139>
17. Hanada T, Kobayashi T, Chinen T, Saeki K, Takaki H, Koga K, et al. IFN γ -dependent, spontaneous development of colorectal carcinomas in SOCS1-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine* [Internet]. 2006 Jun 12;203(6):1391–7. Disponible en: www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20060436
18. Aspod C, Pedroza-Gonzalez A, Gallegos M, Tindle S, Burton EC, Su D, et al. Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13–secreting CD4 $^{+}$ T cells that facilitate tumor development. *Journal of Experimental Medicine* [Internet]. 2007 May 14;204(5):1037–47. Disponible en: www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20061120
19. Langowski JL, Zhang X, Wu L, Mattson JD, Chen T, Smith K, et al. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* 2006 442:7101 [Internet]. 2006 May 10;442(7101):461–5. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nature04808>
20. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews Cancer* 2004 4:7 [Internet]. 2004 ;4(7):540–50. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrc1388>
21. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* (1979). 2013 Mar 29;340(6127):1546–58.
22. de la Fuente López M, Landskron G, Parada D, Dubois-Camacho K, Simian D, Martinez M, et al. The relationship between chemokines CCL2, CCL3, and CCL4 with the tumor microenvironment and tumor-associated macrophage markers in colorectal cancer. *Tumor Biology*. 2018 Nov 1;40(11).
23. Oppermann M. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cellular Signalling* [Internet]. 2004 Nov;16(11):1201–10. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898656804000786>
24. Upadhyaya C, Jiao X, Ashton A, Patel K, Kossenkov A v., Pestell RG. The G protein coupled receptor CCR5 in cancer. *Advances in Cancer Research*. 2020 Jan 1;145:29–47.
25. Brelot A, Chakrabarti LA. CCR5 Revisited: How Mechanisms of HIV Entry Govern AIDS Pathogenesis. *Journal of Molecular Biology*. 2018 Aug 17;430(17):2557–89.
26. Velasco-Velázquez M, Jiao X, de La Fuente M, Pestell TG, Ertel A, Lisanti MP, et al. CCR5 antagonist blocks metastasis of basal breast cancer cells. *Cancer Research* [Internet]. 2012 Aug 1 ;72(15):3839–50. Disponible en:

<https://aacrjournals.org/cancerres/article/72/15/3839/575881/CCR5-Antagonist-Blocks-Metastasis-of-Basal-Breast>

27. Suarez-Carmona M, Chaorentong P, Kather JN, Rothenheber R, Ahmed A, Berthel A, et al. CCR5 status and metastatic progression in colorectal cancer. *Oncolmmunology* [Internet]. 2019 Sep 2;8(9):e1626193. Disponible en:

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2019.1626193>

28. Velasquez S, Eugenin EA. Role of Pannexin-1 hemichannels and purinergic receptors in the pathogenesis of human diseases. *Frontiers in Physiology* [Internet]. 2014 Mar 14;5. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2014.00096/abstract>

29. Jiang JX, Penuela S. Connexin and pannexin channels in cancer. *BMC Cell Biology* [Internet]. 2016 May 24;17(1):105–20. Disponible en: <https://bmcmolcellbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12860-016-0094-8>

30. Vultaggio-Poma V, Sarti AC, di Virgilio F. Extracellular ATP: A Feasible Target for Cancer Therapy. *Cells* 2020, Vol 9, Page 2496 [Internet]. 2020 Nov 17 ;9(11):2496. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/11/2496/htm>

31. Diezmos EF, Sandow SL, Markus I, Shevy Perera D, Lubowski DZ, King DW, et al. Expression and localization of pannexin-1 hemichannels in human colon in health and disease. *Neurogastroenterology & Motility* [Internet]. 2013 Jun;25(6):e395–405. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nmo.12130>

32. Jalaliddine N, El-Hajjar L, Dakik H, Shaito A, Saliba J, Safi R, et al. Pannexin1 Is Associated with Enhanced Epithelial-To-Mesenchymal Transition in Human Patient Breast Cancer Tissues and in Breast Cancer Cell Lines. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2019 Dec 7;11(12):1967. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6694/11/12/1967>

33. Freeman T, Sayedyahosseini S, Johnston D, Sanchez-Pupo R, O'Donnell B, Huang K, et al. Inhibition of Pannexin 1 Reduces the Tumorigenic Properties of Human Melanoma Cells. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2019 Jan 16;11(1):102. Disponible en: <http://www.mdpi.com/2072-6694/11/1/102>

34. Aaron Fierro Arenas, Hermoso Ramello M, de La Fuente López M. Expresión de CCR5 y Panexina-1 y su relación con características clinicopatológicas en cáncer de colon. 2022.

35. How Proximity Ligation Assays (PLA) Work [Internet]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-and-nucleic-acid-interactions/how-pla-works>

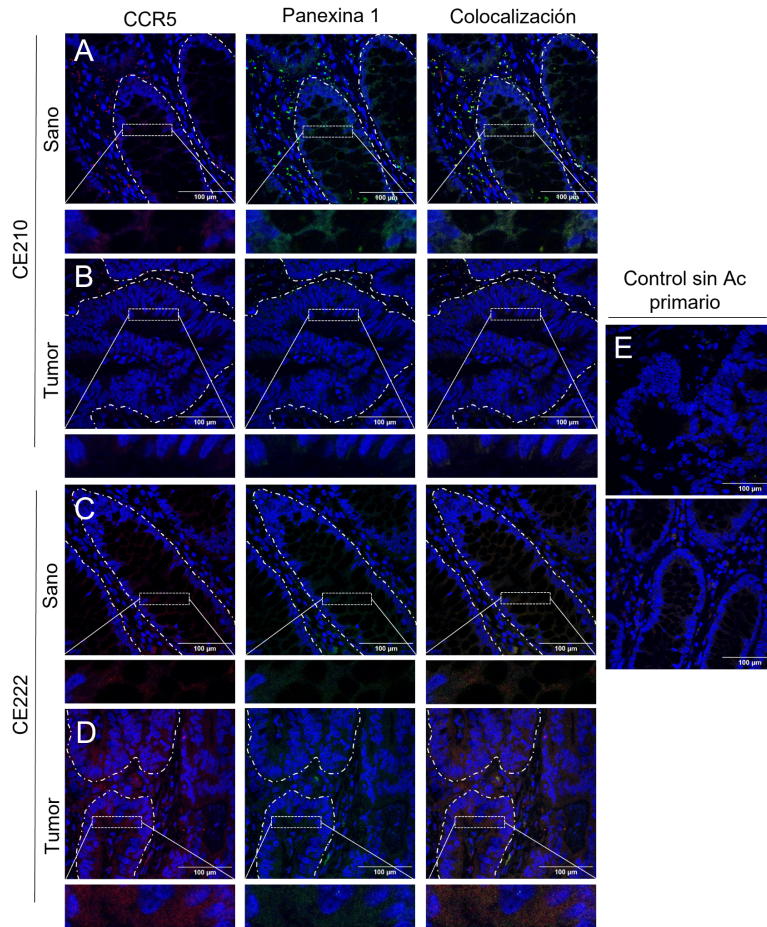
36. Duolink® PLA Fluorescence Protocol [Internet]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/technical-documents/protocol/protein-biology/protein-and-nucleic-acid-interactions/duolink-fluorescence-user-manual>

37. Hegazy M, Cohen-Barak E, Koetsier JL, Najor NA, Arvanitis C, Sprecher E, et al. Proximity Ligation Assay for Detecting Protein-Protein Interactions and Protein Modifications in Cells and Tissues In Situ. *Curr Protoc Cell Biol* [Internet]. 2020 Dec 1;89(1):e115. Disponible en: [/pmc/articles/PMC8041061/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34811111/)
38. S. Bolte, F.P. Cordelieres. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. Vol. 224, *Journal of Microscopy*. 2006.
39. D'Amico D, Valdebenito S, Eugenin EA. The role of Pannexin-1 channels and extracellular ATP in the pathogenesis of the human immunodeficiency virus. *Purinergic Signalling* 2021 17:4 [Internet]. 2021 Sep 20;17(4):563–76. Disponible en: <https://link-springer-com.uchile.idm.oclc.org/article/10.1007/s11302-021-09817-3>
40. Confocal Microscopy - Colocalization of Fluorophores in Confocal Microscopy | Olympus LS [Internet]. Disponible en: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/applications/colocalization/>
41. Li Q, Lau A, Morris TJ, Guo L, Fordyce CB, Stanley EF. A Syntaxin 1, G α , and N-Type Calcium Channel Complex at a Presynaptic Nerve Terminal: Analysis by Quantitative Immunocolocalization. *The Journal of Neuroscience* [Internet]. 2004 Apr 4;24(16):4070. Disponible en: [/pmc/articles/PMC6729428/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14511111/)
42. Zhu Y, Mészáros J, Walle R, Fan R, Sun Z, Dwork AJ, et al. Detecting G protein-coupled receptor complexes in postmortem human brain with proximity ligation assay and a Bayesian classifier. *Biotechniques* [Internet]. 2020 Mar 1;68(3):122–9. Disponible en: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/btn-2019-0083>
43. Lilge L, Dacosta' RS, Lilge11 L, Kost J, Cirroco M, Hassaramtm S, et al. Confocal fluorescence microscopy/macroscopy and microspectrofluorimetry analysis of human colorectal tissue Confocal fluorescence microscopy, microspectrofluorimetry and modeling studies of laser induced fluorescence endoscopy (LIFE) of human colon tissue [Internet]. 1997. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/285884328>
44. Huang Z, Zheng W, Chen R, McLEAN DI, Lui H. Laser-induced autofluorescence microscopy of normal and tumor human colonic tissue. Vol. 24, *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY*. 2004.
45. Gomes I, Sierra S, Devi LA. Detection of receptor heteromerization using in situ proximity ligation assay. *Current Protocols in Pharmacology*. 2016 Dec 1;2016:2.16.1-2.16.31.
46. Zhu X, Zelmer A, Wellmann S. Visualization of protein-protein interaction in nuclear and cytoplasmic fractions by co-immunoprecipitation and in situ proximity ligation assay. *Journal of Visualized Experiments*. 2017 Jan 16;2017(119).
47. Monti M, Orrù S, Pagnozzi D, Pucci P. Interaction proteomics. *Biosci Rep* [Internet]. 2005 Feb;25(1–2):45–56. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16222419/>

48. Miernyk JA, Thelen JJ. Biochemical approaches for discovering protein–protein interactions. *The Plant Journal* [Internet]. 2008 Feb;53(4):597–609. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-313X.2007.03316.x>
49. Braun P, Gingras AC. History of protein–protein interactions: From egg-white to complex networks. *PROTEOMICS* [Internet]. 2012 May 1;12(10):1478–98. Disponible en: <https://onlinelibrary-wiley-com.uchile.idm.oclc.org/doi/full/10.1002/pmic.201100563>
50. Clevers H. Wnt breakers in colon cancer. *Cancer Cell* [Internet]. 2004 Jan 1;5(1):5–6. Disponible en: <http://www.cell.com/article/S1535610803003398/fulltext>
51. Pervaiz A, Ansari S, Berger MR, Adwan H. CCR5 blockage by maraviroc induces cytotoxic and apoptotic effects in colorectal cancer cells. *Med Oncol* [Internet]. 2015 May 1;32(5). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25840792/>

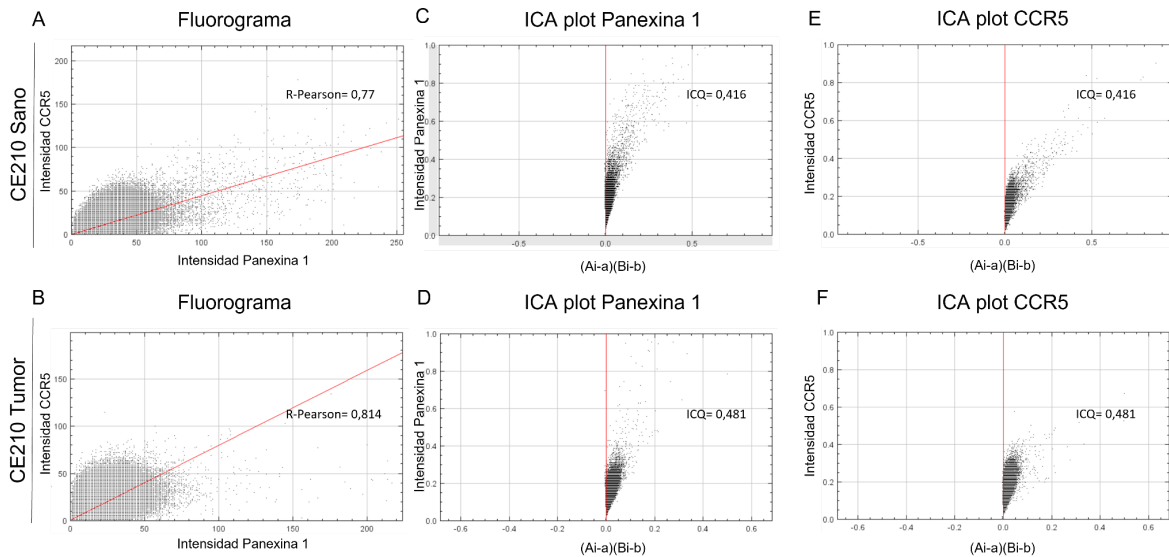
Anexos

Anexo N°1:



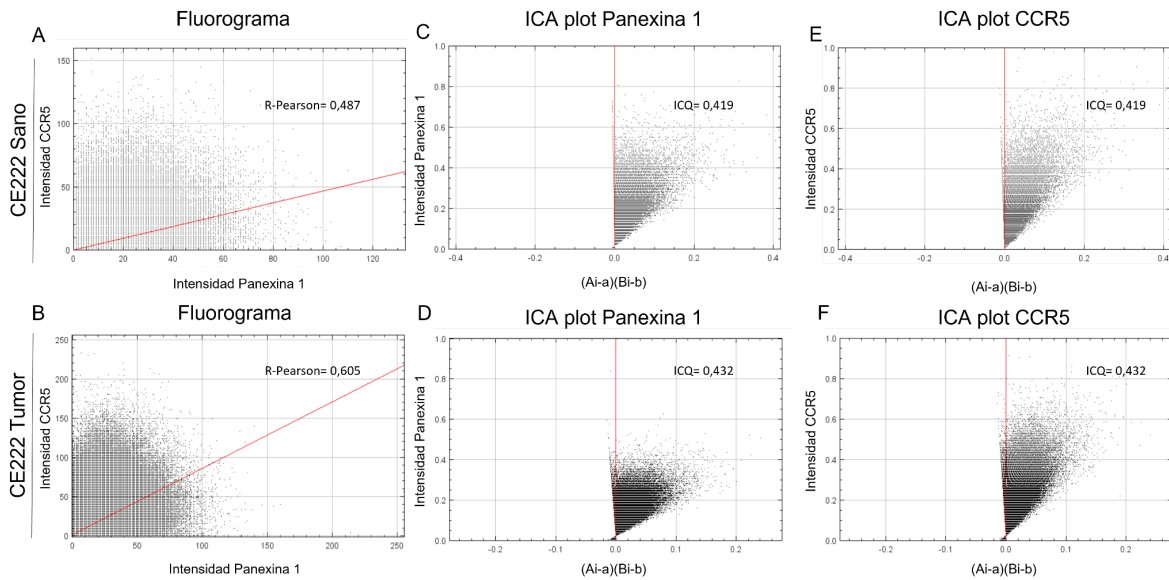
Immunofluorescencia indirecta doble de CCR5 y Panexina 1 en tejidos sanos y tumorales de los pacientes CE210 y CE222. A) y C) Epitelio sano presenta inmunotinción positiva para CCR5 y Panexina 1 en muestras CE210 (estadio I) y CE222 (estadio III). Al superponer los canales se observa colocalización (marca amarilla) entre las señales. B) Células Tumorales no presentan inmunotinción para CCR5 y Panexina 1 en muestra CE210. D) Células tumorales con inmunotinción positiva para CCR5 y Panexina 1 de patrón citoplasmático y de membrana en muestra CE222. Al superponer los canales se observa colocalización de color amarilla entre las señales. E) Control sin anticuerpos primarios. Ampliación 40X. Líneas punteadas delimitando el epitelio sano y las células tumorales. Cuadrados representan zona amplificada.

Anexo N°2:



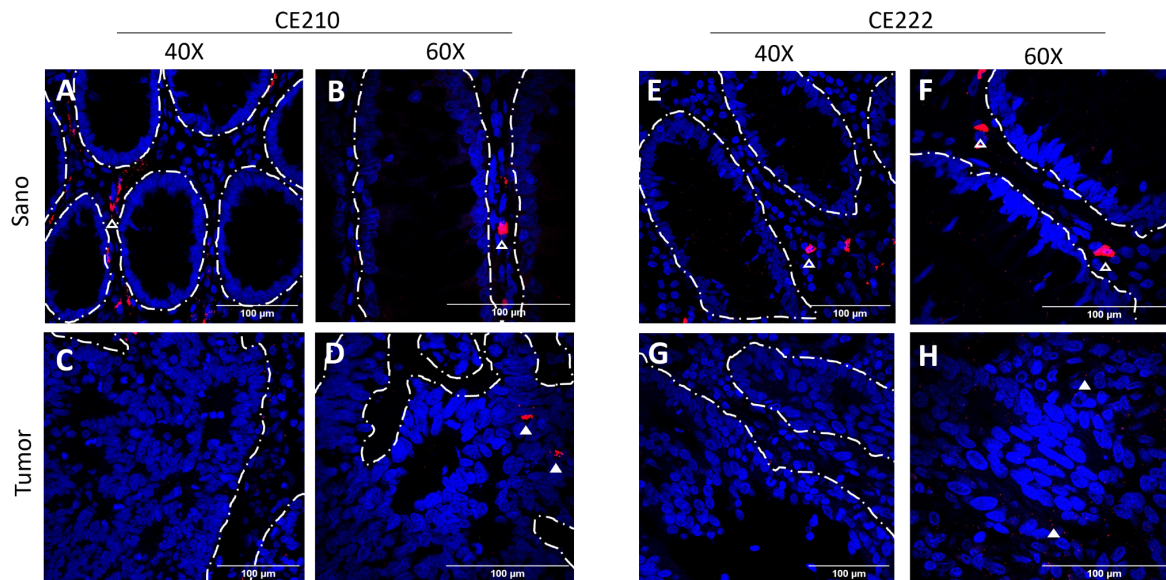
Resultados del análisis de colocación en la muestra CE210 (ROI 1). A) y B) Fluorogramas para el tejido sano y el tejido tumoral, que representa la distribución de los píxeles para los canales verde (Panexina 1) en X y rojo (CCR5) en Y, observándose una colocación parcial positiva con un $R\text{-Pearson} = 0,77$ y $R\text{-pearson} = 0,814$ respectivamente. C), D), E) y F) Gráficos de análisis de correlación de la fluorescencia (ICA). En Y se observa la intensidad de la fluorescencia para Panexina 1 y CCR5 versus en X correspondientes a los valores calculados $(A_i - a)/(B_i - b)$. En tejidos sanos se obtuvo un coeficiente de correlación de la fluorescencia positivo $ICQ = 0,416$. En tejidos tumorales se obtuvo un coeficiente de correlación de la fluorescencia positivo $ICQ = 0,481$. A_i y B_i corresponden a las intensidades de fluorescencia individuales. a y b corresponden a la media de la distribución de N valores para A_i y B_i respectivamente.

Anexo N°3:



Resultados del análisis de colocalización en la muestra CE222 (ROI 1). A) y B) Fluorogramas para el tejido sano y el tejido tumoral, que representa la distribución de los píxeles para los canales verde (Panexina 1) en X y rojo (CCR5) en Y, observándose una colocalización parcial positiva con un $R\text{-Pearson} = 0,487$ y $R\text{-pearson} = 0,605$ respectivamente. C), D), E) y F) Gráficos de análisis de correlación de la fluorescencia (ICA). En Y se observa la intensidad de la fluorescencia para Panexina 1 Y CCR5 versus en X correspondientes a los valores calculados $(A_i - a)(B_i - b)$. En tejidos sanos se obtuvo un coeficiente de correlación de la fluorescencia positivo $ICQ = 0,419$. En tejidos tumorales se obtuvo un coeficiente de correlación de la fluorescencia positivo $ICQ = 0,432$. A_i y B_i corresponden a las intensidades de fluorescencia individuales. a y b corresponden a la media de la distribución de N valores para A_i y B_i respectivamente.

Anexo N°4:



Ensayo de ligación por proximidad en tejidos sanos y tumorales de colon humano de las muestras CE210 y CE222. A) y B) Tejido epitelial sano del paciente CE210 (estadio I). Se observa tejido con escasa señal de PLA en las células epiteliales. C) y D) Tejido tumoral del paciente CE210. Tejido presenta escasa señal de PLA en células tumorales. E) y F) Tejido epitelial sano del paciente CE222 (estadio III). Se observa escasa señal de PLA en células epiteliales. G) y H) Tejido tumoral del paciente CE222. Se observan señales fluorescentes puntiformes de PLA rodeando a las células tumorales. En lámina propia se observa señal fluorescente indicada por el contorno de las puntas de flechas. Las señales PLA se indican con puntas de flechas en color blanco. Ampliación 40X y 60X.

Anexo N°5



Acta de Aprobación

En Santiago de Chile, con fecha 12 de noviembre de 2019, el Comité de Ética de Clínica Las Condes, declara conocer el proyecto de investigación denominado: **Papel del receptor de quimioquina, CCR5, en la progresión del cáncer colorrectal. Proyecto Fondecyt**, cuya investigadora responsable es la Dra Marjorie de la Fuente de esta clínica.

Esta documentación cumple con las normas éticas vigentes en esta institución y considera aspectos específicos del protocolo que deben seguir los sujetos que participarán en el mismo; resguarda su libertad, integridad y confidencialidad en el uso de información; no vulnera la dignidad de los sujetos; no constituye una amenaza bajo ninguna circunstancia ni causa daño emocional o moral a las personas que participen de la investigación. Proporciona información clara y transparente respecto de la investigación, asegurando el derecho a privacidad de los investigados. Asimismo, no se establece pago ni incentivo económico a la participación de las personas, las cuales lo harán a entera voluntad y podrán desistir de participar en cualquier momento mientras la investigación se realice.

Este proyecto, si bien pretende reclutar pacientes de los mismos médicos que participan en el estudio, se asegura la libertad de elección, dejando claramente establecido que pueden rechazar su participación, sin sufrir ningún menoscabo a la atención de salud a la que tienen derecho. Respeto los derechos de los sujetos a consultar y cuida especialmente de invitar a los diferentes enfermos involucrados en el ámbito que se espera estudiar, señalando adecuadamente que de este estudio no se derivan beneficios individuales y sino para el desarrollo científico.

Las muestras retrospectivas que serán utilizadas corresponden a pacientes previamente enrolados en otros proyectos afines y cuyo uso fue debidamente autorizado.

El Comité de Ética de Clínica Las Condes, es la entidad institucional responsable de velar por los derechos de los sujetos involucrados en este proyecto.

Por lo tanto, a través de este medio se pronuncia favorablemente respecto de este proyecto y suscribe esta declaración.

El Comité de Ética de la Investigación de Clínica Las Condes, está conformado por:

Lic. María Verónica Anguita McKay Teóloga – Magister en Bioética
Dr. Manuel Sedano Lorca Médico Ginecólogo-Diplomado en Bioética Dr. Armando Ortiz Pommier
Médico Neurocirujano – Magister en Bioética Dr. Octavio Rojas Gutiérrez Médico Psiquiatra –
Magister en Bioética Abog. María Angélica Sotomayor Abogado -Experta en Bioética
EU. Magdalena Castro Cruz E.U. Magister Epidemiología Clínica
Dr. Patricio Burdiles Pinto Médico
Cirujano-Diplomado en Bioética

Armando Ortiz Pommier
Presidente Comité de Ética de la

Investigación
Clínica Las Condes



Nota: Se tuvo a la vista Protocolo de investigación y Formulario de Consentimiento Informado presentado al Comité de Ética de CLC.

AOP/pav
CC: Dirección Médica
Dirección Académica
Subdirección de Investigación