

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA.



TESIS PROFESIONAL

Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en Bioanálisis clínico molecular, Medicina transfusional y Banco de sangre

“Relación del receptor de quimioquinas CCR5 y del hemicanal Panexina-1 en la progresión del cáncer de colon”

Alumna: Camila Romero

Tutoras: Marjorie Katherine de la Fuente¹

Carolina H. Ribeiro²

1. Centro de Investigación en Biomedicina, Escuela de Medicina, Universidad Finis Terrae

2. Programa Disciplinario de Inmunología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Fecha: Segundo semestre 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA.



TESIS PROFESIONAL

**Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en Bioanálisis clínico
molecular, Medicina transfusional y Banco de sangre**

*“Relación del receptor de quimioquinas CCR5 y del hemicanal Panexina-1 en la
progresión del cáncer de colon”*

Una firma manuscrita en tinta negra que parece decir 'Camila Estefani Romero Torres'.

Camila Estefani Romero Torres

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Marjorie Katherine de la Fuente'.

Prof. Marjorie Katherine de la Fuente, PhD

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Carolina H. Ribeiro'.

Prof. Carolina H. Ribeiro, PhD.

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a mi familia que me inspiró a iniciar este proceso, y que estuvo en todo momento presente para ayudarme.

También a mis amigos y tutoras de tesis que me apoyaron siempre. Muchas gracias por enseñarme tanto. Estoy feliz de que este proyecto contribuya con un pequeño grano de arena a la ciencia y al conocimiento.

ÍNDICE

Contenido	Página
Resumen	4
Abstract	5
Introducción	6
a. Cáncer colorrectal: epidemiología y factores de riesgo	6
b. Microambiente tumoral	7
c. Receptor de quimioquinas CCR5	8
d. Hemicanal Panexina-1	10
e. Relación entre Panexina-1 y el receptor CCR5	11
Hipótesis	13
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
Materiales y métodos	14
Resultados	20
a. Niveles de proliferación celular inducida por la activación de CCR5 en línea celular de cáncer de colon	20
b. Crecimiento tumoral en modelo murino con CCR expuesto a inhibidores de CCR5 y PANX1	25
Discusión	31
Conclusión	35
Bibliografía	36
Anexos	42

Resumen

CCR5 es un receptor de quimioquinas que se encuentra sobreexpresado en células tumorales de diversos tipos de cáncer, identificándose una correlación positiva entre la expresión de CCR5 y el estadio tumoral en cáncer colorrectal. Panexina-1 (PANX1) es un hemicanal de membrana que permite la liberación de ATP al medio extracelular; se ha descrito que esta proteína también se encuentra sobreexpresada en cáncer de colon comparado con tejido sano. Aunque se ha establecido que la activación de CCR5 induce la apertura de PANX1 en células T, esta relación no ha sido explorada en células tumorales. El objetivo de este trabajo fue evaluar la activación de PANX1, mediada por la activación de CCR5, a través de su participación en la proliferación de líneas celulares de cáncer de colon. Para esto, se evaluó la proliferación celular de la línea HCT 116 de cáncer colon humano, mediante el ensayo MTT, estimulando CCR5 con la quimioquina CCL4 en presencia o ausencia de inhibidores de CCR5 y PANX1. Asimismo, se utilizó un modelo *in vivo* de xenoinjerto de células HCT 116 en ratones BALB/c NOD-SCID inmunodeficientes, los que fueron expuestos a los inhibidores de CCR5 y PANX1, Maraviroc y Probenecid, respectivamente. Se midió el volumen tumoral periódicamente para evaluar el crecimiento tumoral, y, posteriormente, se evaluó la expresión de marcadores de proliferación (Ki67) y apoptosis (anexina V) por inmunohistoquímica indirecta. En el ensayo de proliferación *in vitro* identificamos que los inhibidores de CCR5 y PANX1 disminuyen la proliferación celular con respecto a los niveles basales; sin embargo, no se logró observar el vínculo entre CCR5 y PANX1. En el modelo *in vivo*, se observó que el tratamiento con inhibidores de CCR5 y PANX disminuye el volumen tumoral, el que está asociado con una menor expresión del marcador de proliferación Ki67 en los tumores. Estos resultados sugieren que CCR5 y PANX1 participan en la progresión del cáncer de colon. Consideramos que es importante profundizar en el estudio de la relación entre ambas moléculas, y, encaminar nuevas estrategias de tratamiento antitumoral a futuro.

Abstract

CCR5 is a chemokine receptor that is overexpressed on tumor cells of various types of cancer, such as colorectal cancer, in which a positive correlation between CCR5 expression and tumor stage has been described. Pannexin-1 (PANX1), a membrane hemichannel that allows the release of ATP into the extracellular medium, is also overexpressed in colon cancer compared to healthy tissue. Although the link between CCR5 and PANX1 has been established, where CCR5 activation induces PANX1 opening in T cells, this relationship has not been explored in tumor cells. This work aimed to evaluate whether PANX1 activation, mediated by CCR5 activation, participates in cell proliferation in a colon cancer cell line. For this purpose, cell proliferation of the HCT 116 human colon cancer cell line was evaluated, using the MTT assay, by stimulating CCR5 with its ligand CCL4 in the presence or absence of CCR5 and PANX1 inhibitors. In addition, we performed an *in vivo* study using a xenograft murine model of HCT 116 cells inoculated into BALB/c NOD-SCID immunodeficient mice, which were exposed to CCR5 and PANX1 inhibitors, Maraviroc and Probenecid, respectively. Tumor volume was measured periodically to evaluate tumor growth, and, subsequently, the expression of proliferation (Ki67) and apoptosis (annexin V) markers were evaluated by indirect immunohistochemistry. In the *in vitro* proliferation assay, we observed that CCR5 and PANX1 inhibitors decreased cell proliferation in comparison to basal levels; however, no link between CCR5 and PANX1 could be detected. In the *in vivo* model, treatment with CCR5 and PANX1 inhibitors decreased tumor volume, which was associated with a lower expression of the proliferation marker Ki67 in tumors. These results suggest that CCR5 and PANX1 are involved in tumor progression in colon cancer. We consider that it is important to further study the relationship between both molecules, which may bring new data for the development of new strategies for future anti-tumor treatment.

Introducción

a. Cáncer colorrectal: epidemiología y factores de riesgo

El cáncer colorrectal (CCR) corresponde a todos los tumores que afectan al colon y el recto, es decir, desde la válvula ileocecal hasta el recto, y constituye una de las neoplasias más frecuentes a nivel mundial (1,2), correspondiendo al tercer tipo de neoplasia más comúnmente diagnosticada alrededor del mundo, además de ocupar el segundo puesto en términos de mortalidad en el año 2020 (4). Según la GLOBOCAN, con datos estimados al año 2020, la incidencia mundial de CCR, en ambos sexos y todas las edades, fue del 10,7%, y la tasa de mortalidad, del 9,5% (4). Además, se espera que su carga aumente en un 60% para el año 2030, con 2,2 millones de casos nuevos y 1,1 millones de muertes (7). Aunque el 55% de este tipo de cáncer ocurre en países con mayores índices de desarrollo (33), en Chile, según la GLOBOCAN, la tasa de incidencia estimada en ambos sexos al 2020 corresponde al 12,1% y la tasa de mortalidad estimada alcanza el 11,2% (4). Según el informe más reciente del Departamento de Estadísticas e Información de Salud de nuestro país, durante el año 2016 se registraron un total de 1.861 muertes por cáncer de colon y 501 muertes por cáncer de recto, en donde ambas cifras corresponden al 9% del total de muertes oncológicas del año (1). En cuanto a la tasa de supervivencia a 5 años, una vez realizado el diagnóstico, corresponde al 65% para el cáncer colorrectal, aunque este porcentaje va a depender de diversos factores, principalmente del estadio en que se encuentre el cáncer, ya que la detección de la enfermedad en estadios más avanzados tiene un peor pronóstico (2).

Dentro de los factores de riesgo para el desarrollo del CCR se encuentran aquellos que son no modificables, como, por ejemplo, antecedentes familiares de CCR, síndromes de origen

hereditario como la poliposis adenomatosa familiar, síndrome de Lynch, y enfermedades inflamatorias intestinales, como la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, siendo más frecuente en pacientes con colitis ulcerosa que enfermedad de Crohn. Por otro lado, también se encuentran factores relacionados con el estilo de vida, como la falta de actividad física, consumo de tabaco y/o alcohol, dieta pobre en frutas y verduras, dieta alta en grasas y elevado consumo de carnes procesadas. Estos últimos factores son aquellos considerados como modificables para poder prevenir y disminuir las probabilidades de desarrollar CCR (3, 5, 13, 14).

b. Microambiente tumoral

En los tumores sólidos, las células tumorales están en constante comunicación con distintas poblaciones celulares, tales como células epiteliales, células estromales, fibroblastos asociados con el cáncer y células inmunes infiltrantes del tumor, como macrófagos, neutrófilos, mastocitos y linfocitos T y B, conformando un microambiente tumoral (19, 20, 21, 23). Cada una de estas poblaciones celulares participa en distintas señalizaciones que, a nivel individual y a nivel colectivo, pueden afectar las características metabólicas del tumor, como el proceso de apoptosis, la proliferación celular y la angiogénesis. (19, 20, 21). Estas vías de señalización generadas por las células tumorales y las células del microambiente son mediadas por moléculas como citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, factores angiogénicos y enzimas modificadoras de la matriz extracelular (21, 22).

Las quimioquinas son proteínas de tamaño pequeño y de bajo peso molecular pertenecientes a la familia de las citoquinas y que, a través de la unión a sus receptores, promueven efectos pleiotrópicos, es decir, inducen diversos efectos en distintos tipos de células, como, por ejemplo, linfocitos, células dendríticas y células natural killer (NK). Dentro de sus funciones,

destacan la inducción de quimiotaxis celular, inducción de la secreción de citoquinas, proliferación, supervivencia celular y angiogénesis (15, 18, 20, 27). Además, los receptores de quimioquinas también están presentes en la membrana de células de diversos tipos de cáncer, incluyendo CCR, por lo cual las quimioquinas pueden afectar el crecimiento y progresión del tumor (34).

Otro componente molecular del microambiente tumoral son nucleótidos, tales como adenosín trifosfato (ATP). El aumento en los niveles de ATP extracelular se asocia con la progresión tumoral a través de distintos mecanismos, como la proliferación y diferenciación celular, el metabolismo energético y la señalización celular, debido a sus características quimiotácticas e inflamatorias (36, 37). Por otro lado, su disminución está relacionada con una actividad debilitada de las células tumorales, a través de la inhibición de la transcripción, traducción y proliferación celular (11). El ATP también ejerce una fuerte función inmunomoduladora en el microambiente tumoral, y puede regular las respuestas inmunitarias locales mediante la activación de receptores P2 purinérgicos en las células inmunes (12).

c. Receptor de quimioquinas CCR5

El receptor de quimioquinas CCR5 (también conocido como CD139) es un receptor de membrana acoplado a proteína G que se expresa en linfocitos T, monocitos, células dendríticas y células epiteliales en respuesta a estímulos inflamatorios, y cumple una variedad de procesos biológicos, tales como mediador de quimiotaxis y localización celular (24, 25). Además, se ha descrito la importancia del receptor CCR5 en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), ya que corresponde a un co-receptor que permite la entrada del virus a la célula T (26). Actualmente, existen fármacos antagonistas de CCR5, como el Maraviroc, que se unen a ese receptor para evitar la entrada del virus a la célula blanco (24, 26). Por otro lado, CCR5

se ha relacionado con la migración y propagación de células tumorales, y, por lo tanto, con la metástasis en distintos tipos tumorales, como cáncer de cuello uterino, mama, pulmón, melanoma y CCR (27).

Los ligandos de CCR5 incluyen CCL3, CCL4 y CCL5 y cumplen potentes funciones de quimiotaxis (24). CCL3, por ejemplo, juega un papel fundamental en el proceso de desarrollo tumoral mediado por los macrófagos asociados a tumores (TAM), en donde la unión de este ligando mejora la capacidad de los TAM para promover la invasión y metástasis de células tumorales (23). CCR5 se sobreexpresa en tejidos de cáncer de cuello uterino humano en comparación a tejidos sanos, y la represión en su expresión inhibe el crecimiento y proliferación de las células tumorales *in vitro* (29). También se ha descrito la expresión de CCR5 en muestras tumorales metastásicas hepáticas a partir de CCR, así como su interacción con CCL5 producido por linfocitos T, promoviendo la proliferación, invasión celular, y aumento de la producción de metaloproteinasas a partir de TAM (30). En otro estudio en CCR, se evaluó la expresión de CCR5 en tumores primarios y en metástasis hepáticas, donde se observó una correlación positiva entre la expresión de CCR5 en células cancerosas y la progresión del cáncer (24). El eje CCL5-CCR5 se ha relacionado con inducción de metástasis en un modelo murino de cáncer de mama (28). De hecho, Maraviroc también se ha puesto a prueba para evaluar sus efectos en el contexto tumoral en modelos de explantes humanos de CCR con metástasis hepáticas, resultando en la disminución de la concentración de citoquinas protumorales, como el factor de crecimiento endotelial vascular, así como la muerte selectiva de células tumorales (30). Además, también se ha descrito la inducción de apoptosis en células de CCR al ser tratadas con Maraviroc (32). Por lo tanto, la expresión del receptor CCR5 y sus respectivos ligandos es una opción tentativa para construir estrategias de tratamiento antitumoral (23).

d. Hemicanal Panexina-1

Las panexinas son un grupo de glicoproteínas integrales de membrana que incluyen a PANX1, PANX2 y PANX3. PANX1 es un canal de membrana heptamérico que se expresa en la mayoría de las células del organismo, como piel, corazón, cerebro, músculo esquelético, ovarios, testículos y colon, y cumplen un importante rol en la comunicación célula-célula (9, 11). La función de PANX1 consiste en actuar como un canal que permite el paso de moléculas pequeñas a través de la membrana celular. PANX1 media la liberación de ATP desde el medio intracelular hacia al medio extracelular, así como en procesos como la muerte celular con reclutamiento de células inmunitarias (9, 10, 11). Mediante diversos estímulos, entre los cuales se incluye voltaje, potasio, calcio y señales mecánicas, PANX1 puede ser activado induciendo la liberación de ATP, el cual participa en la fosforilación y activación intracelular de la vía de las quinasas, participando, de esta forma, en diversos procesos fisiológicos, como embriogénesis, homeostasis y migración celular, además de actuar como señal diana para las células inmunitarias (11).

En el contexto tumoral, existen estudios que relacionan PANX1 como un marcador de mal pronóstico clínico en el cáncer de mama, en donde se ha visto aumentada su expresión, además de correlacionarse de forma positiva con una mayor infiltración de neutrófilos asociados a tumores o TAN, contribuyendo a un microambiente tumoral inmunosupresor (12). En líneas celulares de cáncer gástrico, se ha observado que la sobreexpresión de PANX1 potencia la capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales (35). En líneas celulares de adenocarcinoma ductal pancreático, se observó que la liberación de ATP al medio extracelular, a través de PANX1, desempeñó un rol importante en la proliferación celular, y que la eliminación del gen *PANX1* atenuó el crecimiento tumoral (36). Según estudios recientes en

relación al cáncer testicular, se ha observado una disminución en la capacidad de migración e invasión de líneas celulares tumorales de Leydig de ratón al ser tratadas con inhibidores de PANX1, como Probenecid y Carbenoxolona; por el contrario, se ha visto que la sobreexpresión de PANX1 en líneas celulares I-10 contribuye a un aumento de la migración e invasión de estas células (11). En estudios recientes realizados en tejidos de CCR, se identificó que los niveles relativos de PANX1 en tejido tumoral son significativamente más altos que en tejido sano (42). Debido a la amplia variedad de efectos biológicos que tiene PANX1 en el cáncer, es fundamental evaluar terapias de bloqueo de este canal como una posibilidad de tratamiento contra el cáncer (36).

e. Relación entre Panexina-1 y el receptor CCR5

Un estudio realizado en linfocitos T CD4+ demostró el vínculo entre PANX1 y CCR5. Se observó que el estímulo de linfocitos T con quimioquinas que activan CCR5 resulta en la apertura transitoria de los canales PANX1 (37). Asimismo, la estimulación de CCR5 con quimioquinas indujo la liberación de ATP al medio extracelular a través de los canales PANX1, a diferencia de las células tratadas con Probenecid (un inhibidor de PANX1), las cuales mostraron una disminución significativa en la liberación de ATP al medio extracelular (37). Por otro lado, se ha descrito que, en la infección temprana por VIH, la unión de la glicoproteína viral gp120 a CD4 y, concomitantemente, a CCR5 y/o CXCR4, genera la apertura del canal PANX1, permitiendo la liberación del ATP al medio extracelular, promoviendo señales que favorecen la infección por el virus (38).

Como se mencionó anteriormente, CCR5 se ha relacionado positivamente con la progresión del tumor, migración y metástasis de las células tumorales de distintos tipos de cáncer. Por otro lado, PANX1 es capaz de influir en el MT mediante la liberación de ATP al medio extracelular, el

cual tiene características quimiotácticas e inflamatorias, con la capacidad de reclutar células inmunes y participar en la migración y proliferación de las células tumorales. Debido a estos antecedentes, y a que la interacción entre CCR5 y PANX1 descrita en linfocitos T haya revelado interesantes mecanismos celulares, es que se propone estudiar la posible relación entre ambos receptores en líneas celulares de CCR.

Hipótesis

La activación del receptor de quimioquinas CCR5 induce la activación de PANX1, favoreciendo la proliferación de líneas celulares de cáncer de colon.

Objetivo general

Evaluar la activación de PANX1 mediada por CCR5 y su participación en la proliferación de células tumorales de cáncer de colon.

Objetivos específicos

1. Determinar los niveles de proliferación celular inducida por la activación de CCR5 en presencia de un inhibidor de PANX1 en líneas celulares de cáncer de colon.
2. Evaluar el papel de CCR5 y PANX1 en el crecimiento tumoral en un modelo murino de CCR.

Materiales y métodos

a. Materiales

La línea celular de cáncer de colon humano HCT 116 fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC, EEUU); ésta corresponde a células tumorales aisladas de un hombre adulto con CCR (39). El medio de cultivo empleado para cultivar las células fue DMEM high glucose (Cytiva HyClone™).

El ligando para estimular a CCR5 corresponde a CCL4 recombinante humano (RD.271-BME) (R&D Systems, Inc., EEUU). El ensayo de proliferación celular se realizó mediante el ensayo colorimétrico y cuantitativo MTT ab211091 (Abcam, Reino Unido). El inhibidor de CCR5 utilizado fue Maraviroc (Merck Maraviroc, PZ0002-25MG) El inhibidor de PANX1 utilizado fue 10Panx (R&D Systems). Los animales utilizados para evaluar el crecimiento de CCR fueron ratones BALB/c NOD-SCID inmunodeficientes, libres de patógenos, provenientes de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, EEUU). El inhibidor de CCR5 utilizado fue Celsentri (Maraviroc) (GlaxoSmithKline, Freirbug, Alemania). El inhibidor de PANX1 utilizado fue Probenecid (Sigma-Aldrich, Bornem, Bélgica). Para la inmunohistoquímica, se utilizaron los anticuerpos anti-Ki67 (Abcam, ab16667, Reino Unido) y anti-Anexina V (Abcam, ab54775, Reino Unido)

b. Ensayo de proliferación celular

El efecto de la estimulación de CCR5 en la proliferación celular se evaluó mediante el ensayo MTT, un ensayo colorimétrico que se basa en la conversión de bromuro de

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (o MTT) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en formazán insoluble, un compuesto de color azul-violeta. Las células metabólicamente activas convierten el MTT en formazán, a diferencia de las células muertas, que pierden esta capacidad. La formación de color se utiliza como marcador para las células viables. La lectura de microplacas se realiza a una densidad óptica de 590 nm, lo cual es proporcional a la cantidad de células viables (40).

Las células HCT 116 se cultivaron en medio DMEM High-Glucose con 10% suero bovino fetal (SFB), a 37°C y 5% de CO₂. Las células fueron sembradas en 3 placas de 96 pocillos, en un volumen total de 100 µL con medio DMEM High-glucose al 10% SFB (10.000 células/pocillo) y se incubaron por 24 horas. Al día siguiente, las células fueron tratadas con inhibidor de CCR5 (Maraviroc) a una concentración de 100 µM y 500 µM o con inhibidor de PANX1 (Probenecid) a una concentración 1 mM y 2 mM, o 10Panx 1,9 mM. Todos los inhibidores fueron diluidos en medio DMEM High glucose al 1% SFB; el tratamiento se realizó durante 10 minutos. Se utilizaron 3 controles, los cuales corresponden al medio de tratamiento sin estímulos o inhibidores, PBS o DMSO. Posteriormente, las células fueron estimuladas con 1 µL (100 ng/mL) y 0.5 µL (50 ng/mL) con CCL4 durante 24, 48 y 72 horas, según corresponda (Figura 1).

Para evaluar la proliferación celular bajo las distintas condiciones, se utilizó el ensayo MTT, según las indicaciones del fabricante. Brevemente, se aspiró el medio de tratamiento y se dispensaron 60 µL de reactivo MTT + medio DMEM High-glucose sin SFB, en una relación 1:1. La placa fue incubada durante 3 horas a 37°C y 5% de CO₂. Posterior a la incubación, se aspiró el sobrenadante, se transfirió este sobrenadante a otra placa, y se dispensaron 90 µL de MTT solvente por pocillo. La placa fue cubierta con papel aluminio y agitada durante 15 minutos para, finalmente, leer a una absorbancia de 590 nm en un espectrofotómetro de microplacas.

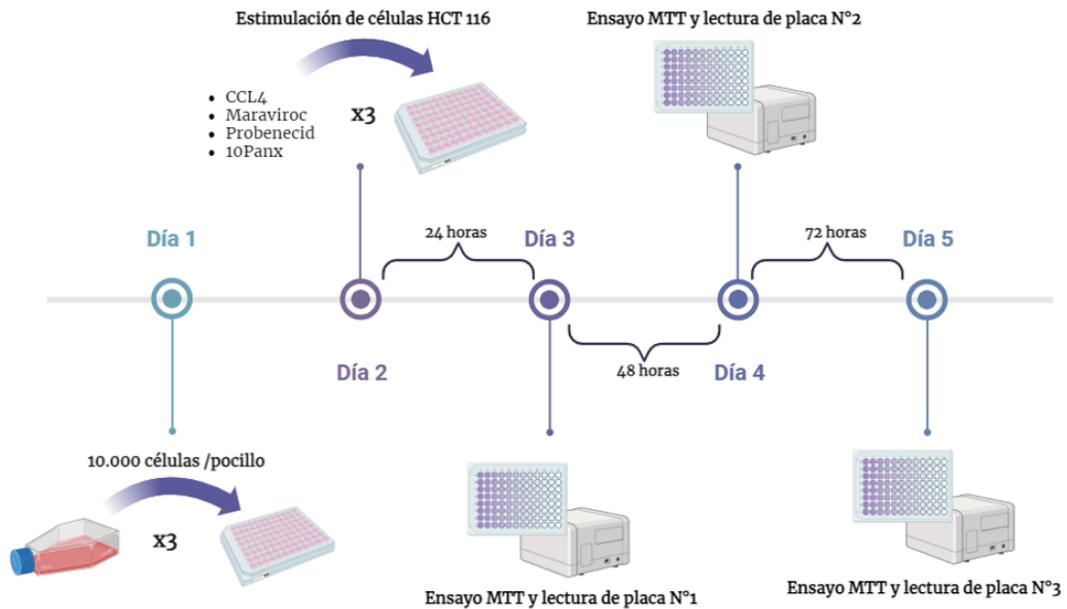


Figura 1: Flujograma experimental del ensayo de proliferación MTT con las células HCT 116. El día 1 se incubaron 10.000 células/pocillo, para, posteriormente el día 2, realizar la estimulación de las células con CCL4 y los respectivos inhibidores. Los días 3, 4, y 5 se realizó el ensayo MTT y la lectura de las placas en un espectrofotómetro de microplacas. Imagen creada a través de Biorender.

c. Modelo murino de cáncer

Treinta ratones BALB/c NOD/SCID fueron inoculados, por vía subcutánea, en la espalda, con 10×10^6 células HCT 116 (1:1 Geltrex Gel en 100 μ L) para inducir la proliferación de las células tumorales. Una vez detectada la aparición del tumor primario, mediante palpación, un grupo de ratones (n=8) fue tratado con Probenecid (150 mg/Kg) vía intraperitoneal y otro grupo (n=5) con Maraviroc celsentri (30 mg/Kg) vía oral para evaluar su efecto en el crecimiento tumoral. Dos grupos de animales control fueron tratados con una solución vehículo por la misma vía de administración que los inhibidores, agua por vía oral (n=6) y solución salina por vía

intraperitoneal (n=6). El volumen del tumor se midió diariamente con una pinza caliper. El volumen del tumor se estimó con la siguiente fórmula: $Ancho \times 2 \times Largo \times \frac{\pi}{6}$. Los ratones fueron sacrificados mediante eutanasia, utilizando sobredosis de anestésico Tiopental, 15 a 25 mg/kg de peso vivo (equivalente a 0,3 a 0,5 ml de Tiobarbital 1g/kg de peso vivo), a través de inyección intraperitoneal, antes de manifestar malestares por el desarrollo del tumor. Los tumores fueron extraídos quirúrgicamente, inmediatamente fijados en paraformaldehído al 4% y embebidos en parafina. Es importante mencionar que el trabajo con el modelo animal fue realizado previamente al desarrollo de esta tesis, por personal especializado. En el marco del presente trabajo, se realizó el análisis de los datos del modelo murino y análisis de tumores por inmunohistoquímica.

Para evaluar el crecimiento tumoral en los distintos grupos animales, se realizó la técnica de inmunohistoquímica indirecta de los marcadores Ki67 y anexina V. Dentro de los marcadores de apoptosis celular, se encuentra anexina V, que tiene afinidad por la fosfatidilserina y permite identificar la célula apoptótica (43). Por otro lado, Ki67, corresponde a un marcador de proliferación celular, el cual tiene un papel fundamental en el ciclo celular, está ausente en células sin replicación y alcanza niveles máximos durante la mitosis (44).

Para desparafinar y rehidratar las muestras, los portaobjetos fueron incubados durante 60 minutos en estufa a 55°C, y posteriormente, expuesta a solvente Neo-Clear™ y batería de alcoholes (etanol 100-70%). Para la recuperación antigénica, se utilizó la solución Tampón Citrato a pH 6.0 (K5204, DakoCytomation) en una olla a presión, seleccionando el programa más intenso (“cocinar carne”) durante 30 minutos, para luego enfriar con agua destilada durante 10 minutos. Luego, se bloquearon las peroxidases con una solución 3% v/v de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Cell Marque, EEUU) por 10 minutos. Enseguida, se realizó el

bloqueo de reactividad inespecífica con suero normal de caballo al 2,5% p/v (30022, Vector Laboratories) por 30 minutos. Sin lavar, se removió el exceso de suero y se procedió a incubar durante 30 minutos con los anticuerpos primarios, anti-anexina V/ANXA5, isotipo IgG (anticuerpo monoclonal de ratón, ab54775, Abcam, Reino Unido), anti-Ki67 [SP6] isotipo IgG (anticuerpo monoclonal de conejo, ab16667, Abcam, Reino Unido) durante 12 horas a 4°C, a una dilución de 1:250 y 1:200, respectivamente. Luego, se aplicó el sistema de detección VECTASTAIN ABC-RHP kit (Peroxidasa, universal) (PK.7200, Vector laboratories CA, EEUU) en dos pasos: primero, se incubó con el anticuerpo secundario biotilado de origen ratón anti-IgG de conejo o de conejo anti-IgG de ratón, para Ki67 y anexina V, respectivamente. por 30 minutos. Después, se incubó por 30 minutos con el sistema de amplificación ABC (avidina, biotina y peroxidasa). Las secciones se revelaron con solución sustrato-cromógeno 3'3-diaminobencidina (DAB) (SK-4105 Vector laboratories) durante 3 segundos y se contrastaron con Hematoxilina de Harris por 20 segundos y para el viraje 3 minutos en agua corriente. Los tejidos se montaron en medio hidrófobo permanente (H-5000, Vector Laboratories). Entre las incubaciones, se lavó con TBS-Tween 20 3x2 minutos. Para validar la especificidad de la técnica, se realizó un control negativo en paralelo, en el cual se reemplazó el anticuerpo primario por suero normal de caballo al 2,5 p/v%, con las mismas condiciones de tiempo e incubación que el anticuerpo primario.

Las imágenes inmunohistoquímicas fueron digitalizadas y analizadas con el programa Qupath (Versión 0.4.4). Para evaluar los niveles de expresión de Ki67 y anexina V, se analizaron cada uno de los tejidos cuantificando el porcentaje de positividad de la tinción DAB, mediante la función "Análisis > Detección de células > Detección de células positivas". Para la cuantificación, se analizó el tejido completo dividido en áreas pequeñas para agilizar el proceso de lectura del programa y evitar errores de lectura, obteniendo anotaciones con los datos de cada tejido. Los datos fueron exportados a una planilla excel para promediar el porcentaje de

positividad de todas las áreas medidas, considerando el número de células positivas con respecto al número total de células detectadas en dicha área.

d. Análisis estadísticos

Una vez obtenidos, los datos de cada uno de los experimentos fueron analizados mediante el programa GraphPad Prism (versión 5.0). Se utilizó Two-Way ANOVA para evaluar las diferencias entre 3 o más grupos. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a un valor de $p < 0,05$.

Resultados

Niveles de proliferación celular inducida por la activación de CCR5 en línea celular de cáncer de colon

La viabilidad y proliferación de la línea celular HCT 116 fue evaluada mediante el ensayo MTT. Para la activación de CCR5, las células fueron estimuladas con CCL4 durante 24, 48 y 72 horas en presencia o ausencia de inhibidores de CCR5 (Maraviroc) o PANX1 (Probenecid y ¹⁰Panx).

La Figura 2 muestra el efecto individual de CCL4 a diferentes tiempos. Al evaluar la quimioquina CCL4 100 ng/mL, se puede observar que no existe un aumento estadísticamente significativo en los niveles de proliferación celular a las 24, 48 y 72 horas en comparación al control. Sin embargo, se logra observar una leve tendencia al aumento de la proliferación celular a las 48 horas, aunque esta respuesta no fue estadísticamente significativa.

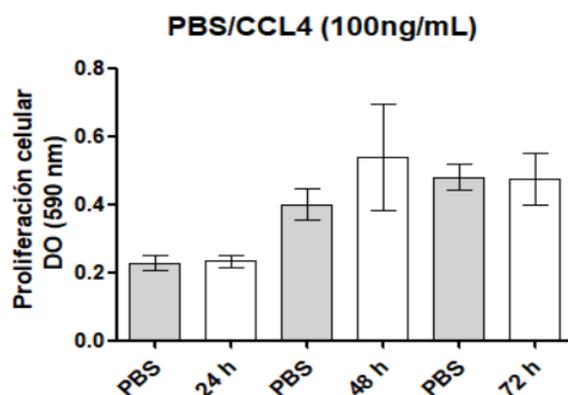


Figura 2: Niveles de proliferación de células HCT 116 estimuladas con CCL4. Los gráficos representan los niveles de proliferación celular expresados en densidad óptica (DO) a 590 nm a las 24, 48 y 72 horas de incubación con el estímulo (n=3). No se observó un aumento estadísticamente significativo en los niveles de proliferación celular en comparación con el control a los distintos tiempos. La prueba estadística utilizada fue *t* test para evaluar las diferencias entre dos grupos.

Asimismo, los niveles basales de proliferación celular no fueron afectados en presencia del inhibidor de CCR5, Maraviroc al 100 y 500 μ M, en comparación con su control DMSO a las 24 y 48 horas (Figura 3A y B). Sin embargo, pudimos observar una disminución significativa en los niveles de proliferación celular a las 72 horas en presencia de Maraviroc al 500 μ M, tanto en ausencia como en presencia de CCL4 (Figura 3C), indicándonos que la inhibición de CCR5 con Maraviroc promueve una disminución en la proliferación de células tumorales de cáncer de colon.

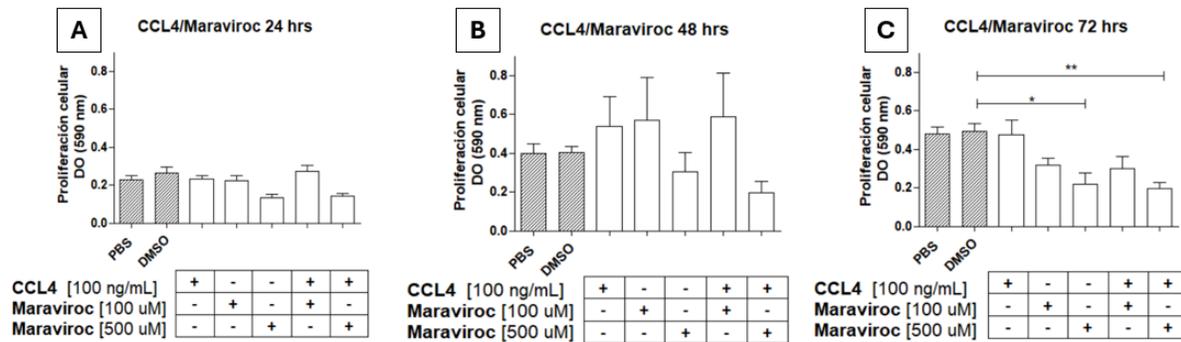


Figura 3: Niveles de proliferación de células HCT 116 estimuladas con CCL4 en presencia o ausencia de Maraviroc. Los gráficos representan los niveles de proliferación celular bajo el estímulo de CCL4 con o sin pre tratamiento con Maraviroc, expresados en densidad óptica (DO) a las 24, 48 y 72 horas de incubación (n=3). El signo [+] representa el estímulo/inhibidor utilizado, según su concentración respectiva. Se utilizó el test de Two-way ANOVA para evaluar las diferencias entre 3 o más grupos. Luego, se aplicó el test de Dunn para las comparaciones múltiples entre grupos y controles. * indica $p < 0.05$. ** indica $p < 0.01$.

De forma similar, para evaluar el papel de PANX1 en la proliferación de la línea celular HCT116, analizamos el efecto de CCL4 en presencia o ausencia de Probenecid, un fármaco que inhibe a PANX1 y otros canales a distintos tiempos de incubación (48). El inhibidor farmacológico de PANX1 (1 mM y 2 mM) no logró disminuir los niveles basales de proliferación celular de forma significativa en comparación a los controles a las 24, 48 y 72 horas. Al evaluar la combinación de CCL4 100 ng/mL con distintas concentraciones de Probenecid, se observa que no existen diferencias significativas en los niveles de proliferación celular en comparación a los controles a las 24, 48 y 72 horas (Figura 4A, B y C).

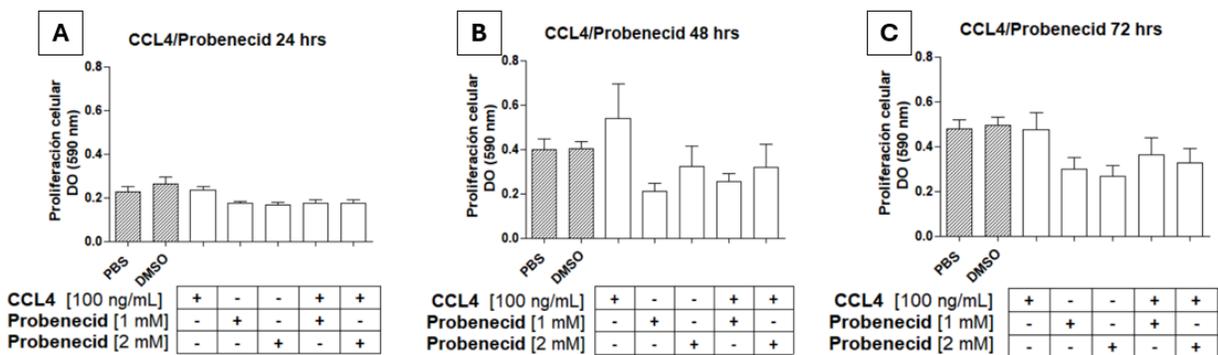


Figura 4: Niveles de proliferación celular en células HCT 116 estimuladas con CCL4 en presencia o ausencia de Probenecid. Los gráficos representan los niveles de proliferación celular bajo el estímulo de CCL4 con o sin pretratamiento con Probenecid, expresados en densidad óptica (DO) a las 24, 48 y 72 horas de incubación (n=3). El signo [+] representa el estímulo/inhibidor utilizado, según su concentración respectiva. No se observaron diferencias significativas en los niveles de proliferación celular a las 24, 48, y 72 horas con respecto a los controles PBS y DMSO. La prueba estadística utilizada fue Two-way ANOVA para evaluar las diferencias entre 3 o más grupos. Luego se aplicó el test de comparación múltiple de Dunn para las comparaciones múltiples entre grupos y los controles.

Adicionalmente, se utilizó un inhibidor farmacológico específico de PANX1, 10Panx, para evaluar el papel de este canal en la proliferación celular (Figura 5). Al evaluar el efecto de CCL4 100 ng/mL, no se observa un aumento significativo en los niveles de proliferación celular en los diferentes tiempos, en comparación al control PBS.

Aunque se observa una tendencia a la reducción en la proliferación de las células tratadas con 10Panx con respecto a los controles PBS y DMSO a las 48 y 72 horas (Figura 5B y 5C), ésta no alcanza a ser considerada estadísticamente significativa. Al analizar el efecto de la combinación de CCL4 100 ng/mL y 10Panx, se observa que, a las 48 horas de incubación,

existe una disminución significativa en los niveles de proliferación celular en comparación con el efecto individual de CCL4 100 ng/mL (Figura 5B).

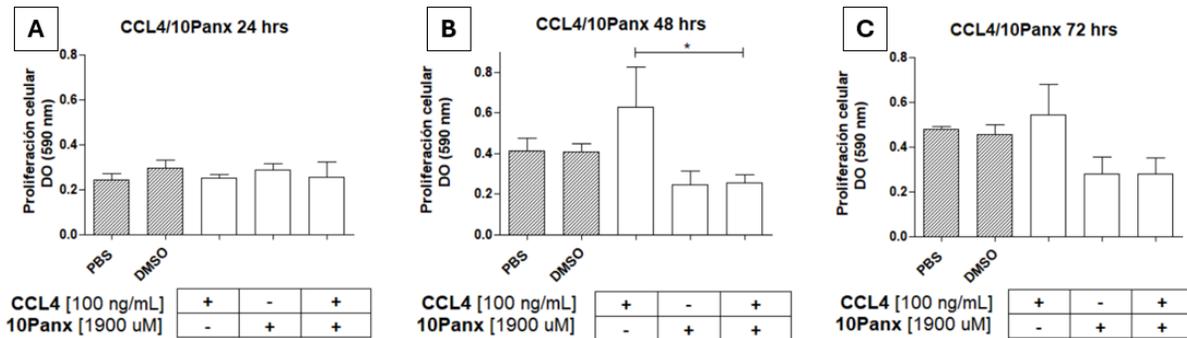


Figura 5: Niveles de proliferación celular en células HCT 116 estimuladas con CCL4 en presencia o ausencia de 10Panx. Los gráficos representan los niveles de proliferación celular bajo el estímulo de CCL4 con o sin pretratamiento con 10Panx, expresados en densidad óptica (DO) a las 24, 48 y 72 horas de incubación (n=3). El signo [+] representa el estímulo/inhibidor utilizado, según su concentración respectiva. Se observó una disminución significativa en los niveles de proliferación a las 24 horas, al comparar CCL4 100 ng/mL y su combinación con 10Panx. La prueba estadística utilizada fue Two-way ANOVA para evaluar las diferencias entre 3 o más grupos. Luego se aplicó el test de comparación múltiple de Dunn para las comparaciones múltiples entre grupos y los controles. Se consideró $p < 0,05$ como estadísticamente significativo para las comparaciones entre los grupos.

Crecimiento tumoral en modelo murino con CCR expuesto a inhibidores de CCR5 y PANX1

En base a nuestros resultados anteriores, los cuales indican una disminución significativa en los niveles de proliferación celular al inhibir CCR5 con Maraviroc, y, una tendencia a la disminución de estos niveles con respecto al nivel basal de proliferación, al inhibir PANX1 con Probenecid y 10Panx decidimos evaluar el efecto de la inhibición de los receptores CCR5 y PANX1 con Maraviroc y Probenecid, respectivamente, en el crecimiento tumoral *in vivo* utilizándose un modelo murino de xenoinjerto de células tumorales humanas. Para esto, a ratones BALB/c NOD/SCID se les implantó, vía subcutánea, la línea celular HCT 116 para inducir la formación de tumores ectópicos. Se inició el tratamiento con Maraviroc (vía oral) y Probenecid (vía intraperitoneal), y sus respectivas soluciones vehículo el día 22 desde la implantación de la línea celular, cuando los tumores ya se mostraban palpables. Se observó un crecimiento sostenido del tumor a partir del día 22 en los ratones controles para Probenecid (círculos azules) y para Maraviroc (triángulos rojos); a su vez los ratones tratados con Probenecid (Círculos celestes) y Maraviroc (Triángulos rosados) mostraron un desaceleramiento del crecimiento tumoral, tal cómo se muestra en la Figura 6A. Al comparar el volumen tumoral al día 25, los ratones tratados con los inhibidores de CCR5 y PANX1 mostraron tumores de volumen significativamente menor en comparación a su respectivo grupo control (Figura 6B).

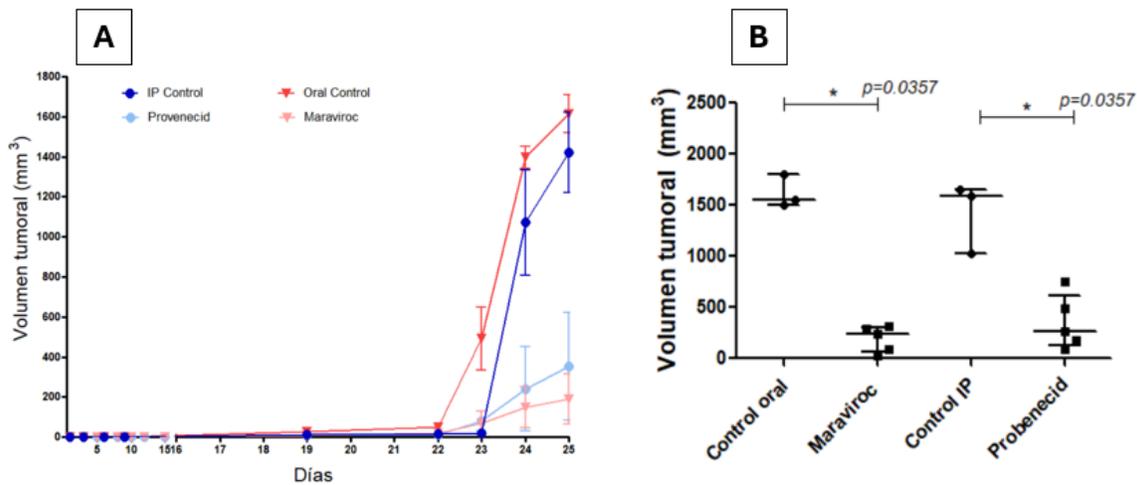


Figura 6: Volumen tumoral en ratones tratados con Maraviroc y Probenecid. Las curvas del gráfico representan el volumen tumoral a través del tiempo en los ratones tratados con Maraviroc (Triángulos rosados), Probenecid (Círculos celestes) y sus respectivos controles, control oral (Triángulos rojos), y control IP (Círculos azules). Las diferencias en el volumen tumoral del gráfico al día 25 fueron significativas, donde los ratones tratados con Maraviroc (n=5) y Probenecid (n=5) mostraron un menor volumen tumoral en comparación a sus respectivos controles, es decir, control oral (n=3), y control IP (n=3). La prueba estadística utilizada fue Mann Whitney y se consideró $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

Para evaluar la proliferación celular en el tejido tumoral, decidimos cuantificar los marcadores Ki67 y Anexina V mediante inmunohistoquímica.

Al evaluar el marcador de proliferación ki67, se observó que los tejidos de los ratones tratados con Maraviroc mostraban un menor porcentaje de área con marca inmunoreactiva en comparación al tejido control (Figura 8), sugiriendo una disminución de la proliferación celular.

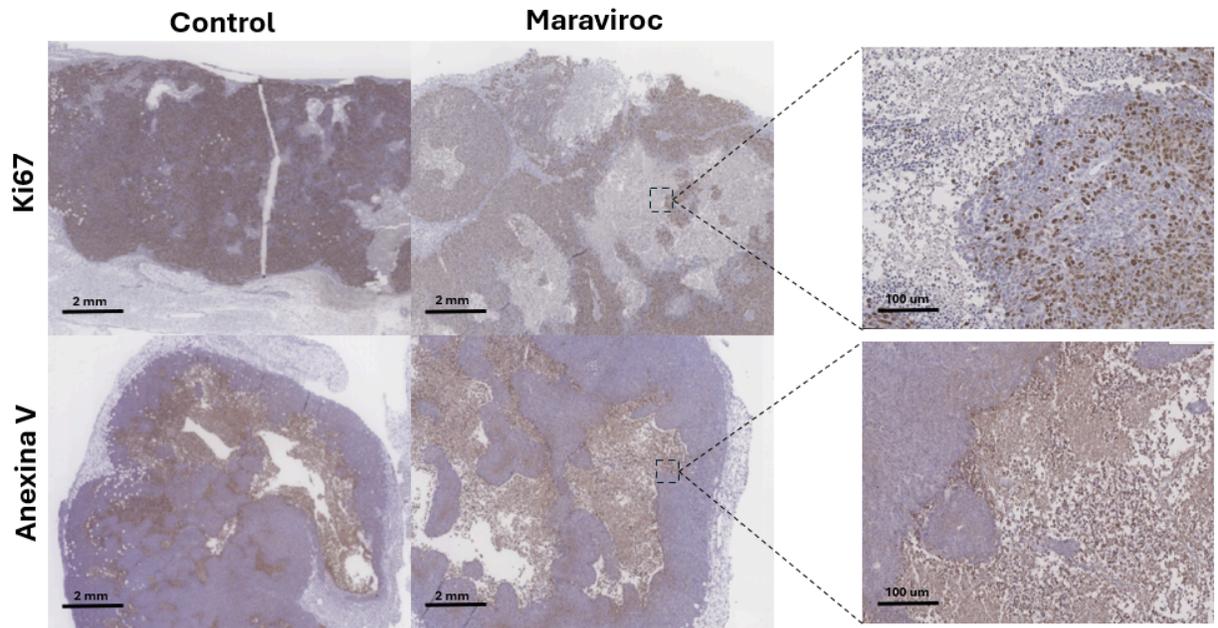


Figura 7: Imágenes representativas de inmunohistoquímica aplicada en tumores extirpados de ratones control y tratados con Maraviroc, marcados con Ki67 y Anexina V. (A) corresponde al control oral Ki67 y (C) al control oral para anexina V. (B) y (D) corresponden a los ratones tratados con Maraviroc, y marcados para Ki67 y anexina V, respectivamente. Se puede observar que hay menor contenido de áreas viables en el tejido (B) en comparación a su control (A).

Al analizar Ki67 para los ratones tratados con Probenecid, estos mostraron un menor porcentaje de área con marca inmunoreactiva en comparación al tejido control (Figura 9), sugiriendo una disminución de la proliferación celular.

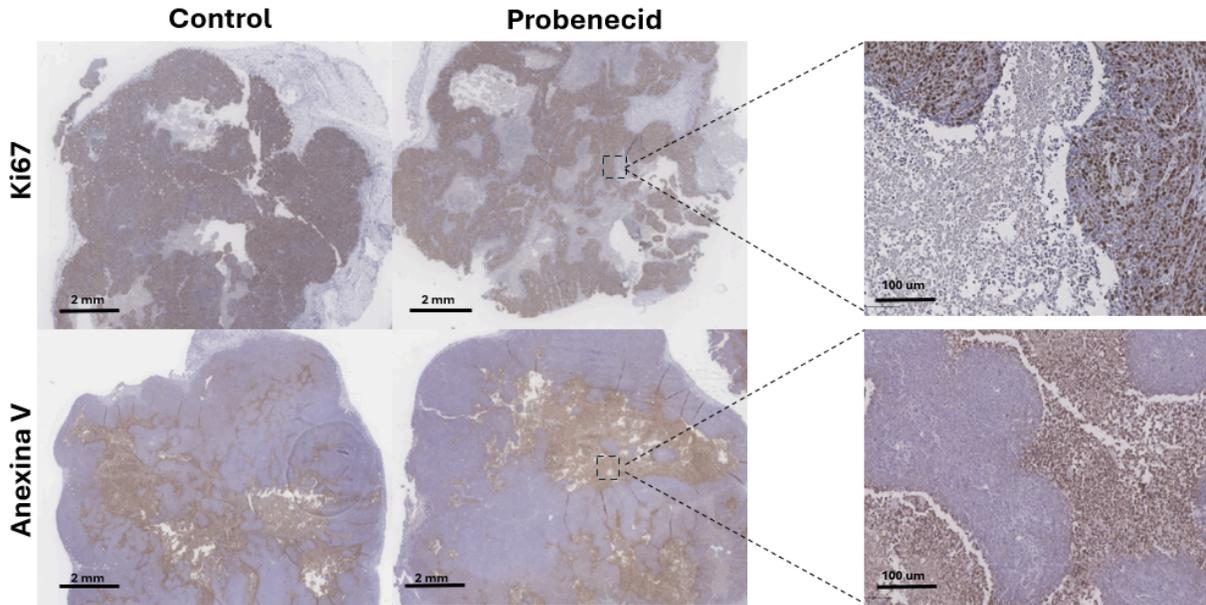


Figura 8: Imágenes representativas de la inmunohistoquímica aplicada en tumores extirpados de ratones control y tratados con Probenecid. (A) corresponde al control marcado para Ki67 y (C) al control marcado para anexina V. (B) y (D) corresponden a los ratones tratados con Probenecid, y marcados para Ki67 y anexina V, respectivamente. Se puede observar que hay menor contenido de áreas proliferantes en el tejido (B) en comparación a su control (A).

Se cuantificó el efecto de Maraviroc sobre los niveles de expresión de marcadores de proliferación y muerte celular en los tumores al inhibir CCR5 a través del análisis acumulado de imágenes obtenidas de 10 ratones (Figura 10). Se observó una disminución en los niveles de expresión del marcador Ki67 en el grupo de ratones tratados con Maraviroc, en comparación con el grupo control (Figura 10A). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de Anexina V para los ratones tratados con Maraviroc en comparación con el grupo control (Figura 10B).

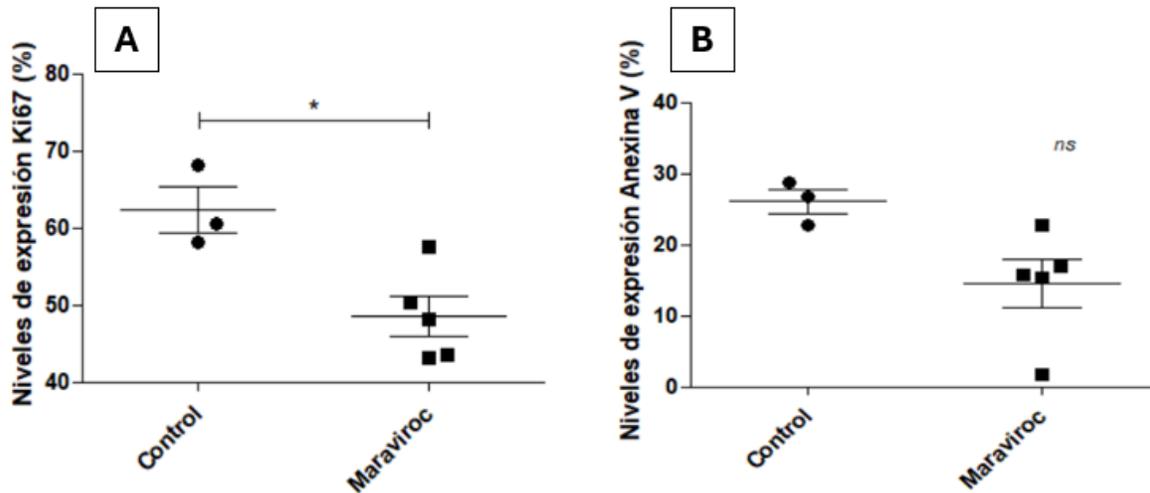


Figura 9: Niveles de expresión de Ki67 y Anexina V en xenoinjerto de tumores tratados con Maraviroc. Comparación entre los niveles de expresión de Ki67 y Anexina V en ratones tratados con Maraviroc (n=5) y el grupo control (n=3). Los niveles de expresión de Ki67 fueron más bajos en ratones tratados con Maraviroc en comparación con el grupo control. La prueba estadística utilizada fue Mann Whitney; *, $p < 0,05$. ns: no significativo.

También evaluamos el efecto de Probenecid en la expresión de marcadores de proliferación y muerte celular en los tumores, a través del análisis acumulado de imágenes obtenidas de 8 ratones (Figura 10). Pudimos observar una disminución significativa en los niveles de expresión de Ki67 en el grupo de ratones tratados con Probenecid, en comparación con el grupo control (Figura 10A). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de Anexina V en los tumores de ratones tratados con Probenecid, en comparación con el grupo control (Figura 10B)

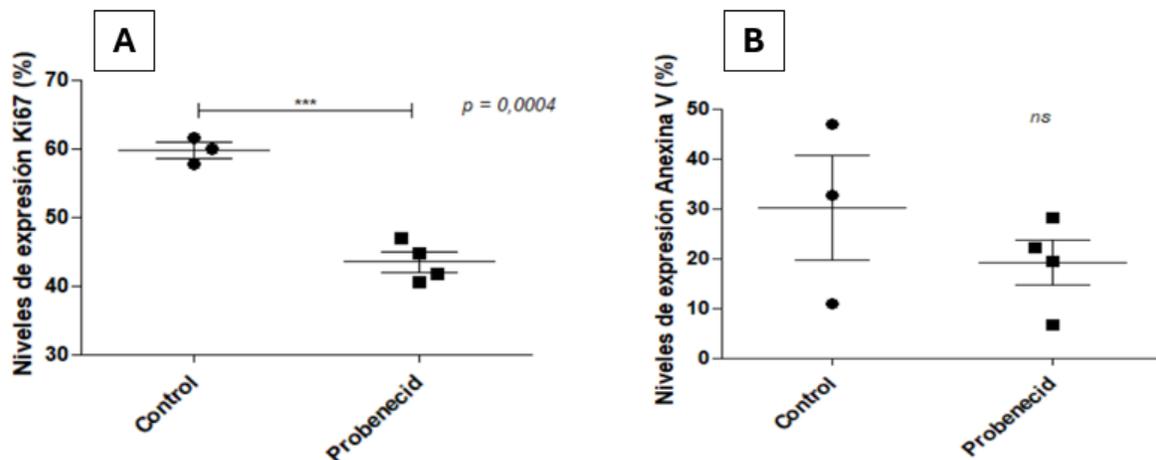


Figura 10: Niveles de expresión de Ki67 y Anexina V en tratados con Probenecid.

Comparación entre los niveles de expresión de Ki67 y Anexina V en ratones tratados con Probenecid (n=4) y el grupo control (n=3). Se observó una disminución en los niveles de expresión de Ki67 en el grupo de ratones tratados con Probenecid en comparación con el grupo control. No se observó un aumento significativo en los niveles de expresión de anexina V. La prueba estadística utilizada fue Mann Whitney; *, $p < 0,05$. ns: no significativo.

En conjunto, nuestros resultados indican que CCR5 y PANX1 participan en los procesos de proliferación celular, y crecimiento tumoral, disminuyendo los niveles de éstos al utilizar sus respectivos inhibidores, es decir, Maraviroc y Probenecid.

Discusión

El presente estudio permitió analizar el rol de CCR5 y PANX1 en la proliferación tumoral utilizando como modelo una línea celular de cáncer de colon. El objetivo principal de nuestro trabajo fue evaluar la activación de PANX1 mediada por la activación de CCR5 y su participación en la proliferación de células tumorales de CCR. Al estimular CCR5 con CCL4, esperábamos encontrar un aumento en los niveles de proliferación, mientras que el uso de inhibidores de CCR5 y PANX1 podrían revertir este efecto, sugiriendo la participación de estas moléculas en la proliferación celular. Sin embargo, la activación de CCR5 con la quimioquina CCL4, contrariamente a lo esperado, no aumentó de manera significativa los niveles de proliferación celular en comparación a los controles utilizados, por lo que no se puede afirmar, mediante los experimentos conducidos en este trabajo, que la activación de CCR5 induce proliferación celular mediante PANX1. Según lo anterior, es probable que CCL4 tenga una menor afinidad por CCR5 en comparación a otros receptores de quimioquinas (CCR1, CCR8), y, en este sentido, se podrían realizar ensayos de proliferación utilizándose otros ligandos de CCR5, como CCL5; ya que se ha reportado que éste aumenta la proliferación y la migración de células de CCR *in vitro* (46). Además, es importante mencionar que, en un estudio realizado en ratones con metástasis de cáncer de colon en hígado, se observó una regulación positiva del eje CCR5, ya que los niveles de expresión de los genes de CCL3, CCL4 y CCL5 estaban aumentados, respaldando la participación de CCR5 y sus ligandos afines en cáncer (47), lo que sugiere un importante rol protumoral del receptor CCR5. Por otro lado, puede ocurrir que CCL4 active el receptor, pero no necesariamente la respuesta inducida va a promover la proliferación celular, por lo que se podría considerar evaluar otras respuestas que afecten la progresión tumoral, tales como migración e invasión celular, a través del ensayo de migración transwell o ensayo de la herida. También se debe considerar la alternativa de que los niveles de CCR5 en la línea celular tumoral no estaban en sus niveles de expresión normales, debido a los

constantes cambios de expresión génica que estas células pueden sufrir. Por otro lado, para comprobar la relación de CCR5 y PANX1 en cáncer, se sugiere un ensayo que permita evaluar la activación del canal PANX1 mediante la liberación de ATP al medio extracelular, luego de la activación de CCR5, así como fue evaluado previamente en un modelo de LT CD4+ (37).

Si bien los resultados de este estudio no permiten confirmar la relación entre CCR5 con PANX1, nuestros resultados sugieren que estas moléculas pueden estar implicadas por separado en la proliferación celular. Maraviroc, actualmente, es el único antagonista de CCR5 disponible clínicamente que se ha utilizado para el tratamiento del VIH; en el último tiempo, se ha puesto en evidencia su efecto antineoplásico en una variedad de cánceres primarios y metastásicos (49). Nuestros experimentos *in vivo* muestran que Maraviroc disminuye los niveles de proliferación de células tumorales y disminuye la expresión de Ki67, un marcador de proliferación celular, en el modelo de xenoinjerto tumoral, confirmando el rol protumoral de CCR5 en CCR, lo cual es consistente con lo expuesto en la literatura, en donde se ha reportado que el uso de Maraviroc *in vivo* en modelos de ratón anula el crecimiento de células CCR en hígado, e induce, incluso, la remisión completa de la metástasis hepática (47). La inhibición de CCR5 y su rol tumoral también han sido puestos a prueba en cáncer de hígado, páncreas y mama, disminuyendo el crecimiento, invasión y metástasis celular, destacando la importancia de este receptor como blanco terapéutico (48). Además, estudios anteriormente realizados por el laboratorio en biopsias de pacientes con CCR, han demostrado que existe un aumento en los niveles de expresión de CCR5 en tejido tumoral en comparación con el tejido sano (42) También, se observó que, al inhibir el receptor CCR5 con Maraviroc, e intentar estimular al mismo tiempo con la quimioquina CCL4, disminuyeron los niveles de proliferación celular de manera significativa en comparación al grupo de células que solo fueron estimuladas con CCL4, lo que indica la participación de CCR5 en la proliferación celular y por lo tanto, su rol en la progresión tumoral.

Por lo tanto, estos efectos antitumorales observados proponen a inhibidores de CCR5 como una alternativa terapéutica interesante de seguir estudiando, tanto en CCR como en otros tipos de cánceres, ya que se ha demostrado que posee efectos antineoplásicos importantes, como la inhibición de la proliferación, migración, y la interferencia en las cascadas de señalización implicadas en el ciclo celular (47). En este sentido, Maraviroc ya ha sido considerado un fármaco para la terapia contra el cáncer de colon y ya se encuentra en etapa de estudio (53).

PANX1, por su parte, es un hemicanal que permite el paso de moléculas pequeñas, como el ATP, al medio extracelular, permitiendo que se pueda sostener la proliferación celular y la metástasis tumoral (50, 51). Se ha observado, en células cancerosas testiculares, *in vitro*, que el silenciamiento génico de Panexina-1 inhibe la capacidad de migración, e invasión celular, disminuyendo, además, los niveles de ATP en el medio extracelular; por el contrario, su sobreexpresión aumenta la capacidad migratoria e invasiva de esta línea celular (11). La evidencia acumulada también indica que PANX1 se sobreexpresa en una variedad de cánceres y regula el microambiente tumoral mediante la liberación de ATP, tales como el cáncer de mama, cuello uterino, páncreas, CCR, entre otros (49) En nuestro estudio *in vitro*, no encontramos una disminución significativa en los niveles de proliferación celular al inhibir PANX1, en presencia de CCL4, mediante el uso de Probenecid, un fármaco que actualmente se utiliza para tratar la gota, y que se ha propuesto en la literatura como un candidato interesante de estudiar en el contexto tumoral, ya que se ha observado que tiene un efecto antineoplásico (51). Sin embargo, se puede observar que, aunque no sea una disminución significativa, existe una tendencia a la disminución de la proliferación celular a las 48 y 72 horas de incubación con respecto a los controles. Similarmente, el inhibidor farmacológico específico de PANX1, 10Panx, muestra una disminución significativa de la proliferación celular al comparar la combinación 10Panx/CCL4 y el efecto individual de CCL4. Estudios previos

realizados en el laboratorio en biopsias de CCR, revelaron que existe una mayor expresión de PANX1 en tejido tumoral en comparación al tejido sano, respaldando el rol de este hemicanal en la progresión tumoral (42). Por otro lado, al evaluar su papel en el crecimiento en el modelo de xenoinjerto tumoral, se observó una disminución significativa en el volumen del tumor en el grupo de ratones tratados con Probenecid. Los tejidos obtenidos a partir de los tumores extirpados de los ratones tratados y control, analizados mediante inmunohistoquímica, mostraron de forma visual un menor contenido de áreas viables en comparación al grupo control, lo que concuerda, a su vez, con una disminución significativa en los niveles de expresión de Ki67, y por lo tanto, en los niveles de proliferación celular.

Como se mencionó anteriormente, PANX1 tiene un rol fundamental en la liberación de ATP al medio extracelular, por lo que se debe considerar que la activación de estas vías en la célula tumoral puede generar señales hacia otras células tumorales o células partícipes del microambiente tumoral, generando un efecto tanto autocrino como paracrino. Tras la liberación del ATP al medio extracelular, varias enzimas degradan el ATP en ADP y AMP, los cuales pueden estimular receptores purinérgicos, como P2X y P2Y, los cuales están implicados en diversos procesos celulares, incluyendo proliferación, diferenciación, migración celular, inflamación y secreción de citoquinas (52). En cuanto a las vías inflamatorias, estas sirven para proteger al huésped; sin embargo, la desregulación de esta respuesta puede resultar patológica, tal como en el cáncer, en donde el ambiente inflamatorio puede contribuir a la progresión maligna mediante la inhibición de la vigilancia inmune mediada por inflamación, el inicio de la angiogénesis y la creación de un entorno que promueve el crecimiento (53). En melanoma, los receptores de membrana regulados por ATP, P2X7 y PANX1 se han implicado directamente en el crecimiento del tumor (52). Asimismo, células de cáncer de mama que expresan una mutante de PANX1 que regula su función de manera positiva, presentan una ventaja de supervivencia en la progresión de la metástasis, ya que el ATP liberado actúa sobre

los receptores purinérgicos (P2X y P2Y) para suprimir la apoptosis celular (52). Debido al rol que desempeña PANX1 en cáncer, participando en procesos como proliferación e inflamación, que contribuyen a la progresión tumoral, es que se considera una opción interesante de seguir estudiando y explorando como potencial blanco terapéutico.

Conclusión

El CCR es uno de los tipos de cáncer más prevalentes a nivel mundial, y millones de personas se ven afectadas por esta patología año tras año, por lo que es fundamental estudiar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en esta enfermedad para poder encontrar nuevas opciones terapéuticas que frenen su progresión. En nuestro estudio, analizamos la relación entre CCR5 y PANX1, dos moléculas que se han descrito como posibles opciones terapéuticas a futuro debido a su influencia en diversos tipos de cáncer. La proliferación celular, un proceso fundamental en la progresión tumoral, se vió afectada al inhibir CCR5 con Maraviroc en un modelo murino de CCR5, situación similar que ocurre al utilizar inhibidores farmacológicos de PANX1. Si bien no se pudo establecer la relación entre CCR5 y PANX1 y confirmar la hipótesis, nuestro estudio muestra un camino experimental interesante de seguir explorando para poder dilucidar la conexión entre ambas moléculas. La evidencia acumulada actual, y nuestros resultados, aportan información valiosa con respecto a CCR5 y PANX1 y su rol en el crecimiento tumoral, por lo que es fundamental invertir esfuerzos en investigaciones adicionales que permitan seguir profundizando en la participación que tienen ambas moléculas en la progresión del cáncer CCR.

Bibliografía

1. Guía de Práctica Clínica - Problema de salud AUGE N° 70, Cáncer Colorectal en personas de 15 años y más [Internet]. Ministerio de salud de Chile. 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. American Society of Clinical Oncology (ASCO). Cáncer colorrectal: Estadísticas [Internet]. Cancer.net. 2022. Disponible en: <https://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-colorrectal/estad%C3%ADsticas>
3. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterology Review/Przegląd Gastroenterologiczny*. 2019;14(2):89-103. doi:10.5114/pg.2018.81072.
4. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram IBF. Global Cancer Observatory: Cancer Today [Internet]. 2020
5. Freddie Bray BSc, MSc, PhD, Jacques Ferlay ME, Isabelle Soerjomataram MD, MSc, PhD, Rebecca L. Siegel MPH, Lindsey A. Torre MSPH, Ahmedin Jemal PhD, DVM. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *ACS journals*. 12/ 09/2018;68:394–424.
6. Edwards BK, Ward E, Kohler BA, Ehemann C, Zauber AG, Anderson RN, Jemal A, Schymura MJ, Lansdorp-Vogelaar I, Seeff LC, van Ballegoijen M, Goede SL, Ries LA. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer*. 2010 Feb 1;116(3):544-73. doi: 10.1002/cncr.24760. PMID: 19998273; PMCID: PMC3619726.
7. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017 Apr;66(4):683-691. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310912. Epub 2016 Jan 27. PMID: 26818619.
8. Wu K, Keum N, Nishihara R, Giovannucci EL. Cancers of the colon and rectum. In: MJ Thun, MS Linet, JR Cerhan, CA Haiman, D, Schottenfeld eds. *Cancer Epidemiology and Prevention*. 4th ed. New York, NY: Oxford University Press; 2018: 681- 706.
9. Laird DW, Penuela S. Pannexin biology and emerging linkages to cancer. *Trends Cancer*. 2021 Dec;7(12):1119-1131. doi: 10.1016/j.trecan.2021.07.002. Epub 2021 Aug 11. PMID: 34389277.

10. Ambrosi, C., Gassmann, O., Pranskevich, J. N., Boassa, D., Smock, A., Wang, J., Dahl, G., Steinem, C., & Sosinsky, G. E. (2010). Pannexin1 and pannexin2 channels show quaternary similarities to connexons and different oligomerization numbers from each other. *Journal of Biological Chemistry*, 285(32). <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.115444>
11. Haofeng Liu, Min Yuan, Yanxue Yao, Dandan Wu, Shuying Dong, Xuhui Tong, In vitro effect of Pannexin 1 channel on the invasion and migration of I-10 testicular cancer cells via ERK1/2 signaling pathway, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 117, 2019, 109090, ISSN 0753-3322, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109090>.
12. Chen W, Li B, Jia F, Li J, Huang H, Ni C, et al. High PANX1 Expression Leads to Neutrophil Recruitment and the Formation of a High Adenosine Immunosuppressive Tumor Microenvironment in Basal-like Breast Cancer. *Cancers* [Internet] 2022;14(14):3369. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers14143369>
13. Hano García Olga Marina, Wood Rodríguez Lisette, Galbán García Enrique, Abreu Vázquez María del Rosario. Factores de riesgo para el cáncer colorrectal. *Rev cubana med* [Internet]. 2011 Jun [citado 2022 Nov 03] ; 50(2): 118-132. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232011000200002&lng=e
[s](#)
14. What Are the Risk Factors for Colorectal Cancer? [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2022 [citado el 28 de noviembre de 2022]. Disponible en: https://www.cdc.gov/spanish/cancer/colorectal/basic_info/risk_factors.htm
15. De La Fuente M, Hermoso M, Abedrabo M, Carrillo K, Sebastián L. Mediadores inflamatorios y su influencia en la evolución del cáncer colorrectal [Internet]. Available from: <https://www.redclinica.cl/Portals/0/Users/014/14/14/1108.pdf>
16. Nguyen HT, Duong HQ. The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncol Lett*. 2018;16:9-18. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8679>
17. Estela Fernandez C. Identificación de células inmunitarias infiltrantes en el complejo microambiente tumoral para el pronóstico y diagnóstico del cáncer de colon. *Rev. Cirugia*. 2022;74(5). Disponible en: doi:[10.35687/s2452-454920220051599](https://doi.org/10.35687/s2452-454920220051599) [Accessed 4 nov. 2022].
18. N. Mukaida, S.-I. Sasaki, T. Baba Chemokines in cancer development and progression and their potential as targeting molecules for cancer treatment *Mediat. Inflamm.*, 170381 (2014), 10.1155/2014/170381
19. De la Fuente López M, Landskron G, Parada D, Dubois-Camacho K, Simian D, Martínez M, et al. The relationship between chemokines CCL2, CCL3, and CCL4 with the tumor

- microenvironment and tumor-associated macrophage markers in colorectal cancer. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2022 Nov 28];40(11):1010428318810059. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30419802/>
20. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. *Journal of Immunology Research* [Internet]. 2014;2014:1–19. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4036716/>
 21. Burkholder B, Huang R-Y, Burgess R, Luo S, Jones VS, Zhang W, et al. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2014 Apr;1845(2):182–201.
 22. L. Yan, GM Anderson, M. DeWitte y MT Nakada, "Therapeutic potential of cytokine and chemokine antagonists in cancer therapy", *European Journal of Cancer*, vol. 42, núm. 6, págs. 793–802, 2006.
 23. Qin R, Ren W, Ya G, Wang B, He J, Ren S, Jiang L, Zhao S. Role of chemokines in the crosstalk between tumor and tumor-associated macrophages. *Clin Exp Med*. 2022 Sep 29. doi: 10.1007/s10238-022-00888-z. Epub ahead of print. PMID: 36173487.
 24. Suarez-Carmona M, Chaorentong P, Kather JN, Rothenheber R, Ahmed A, Berthel A, Heinzelmann A, Moraleda R, Valous NA, Kosaloglu Z, Eurich R, Wolf J, Grauling-Halama S, Hundemer M, Lasitschka F, Klupp F, Kahlert C, Ulrich A, Schneider M, Falk C, Jäger D, Zoernig I, Halama N. CCR5 status and metastatic progression in colorectal cancer. *Oncoimmunology*. 2019 Jul 13;8(9):e1626193. doi: 10.1080/2162402X.2019.1626193. PMID: 31428524; PMCID: PMC6685512.
 25. Binhan Wang, Manni Wang, Danyi Ao, Xiawei Wei, CXCL13-CXCR5 axis: Regulation in inflammatory diseases and cancer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, Volume 1877, Issue 5, 2022, 188799, ISSN 0304-419X, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188799>.
 26. Woollard SM, Kanmogne GD. Maraviroc: a review of its use in HIV infection and beyond. *Drug Des Devel Ther*. 2015 Oct 1;9:5447-68. doi: 10.2147/DDDT.S90580. PMID: 26491256; PMCID: PMC4598208.
 27. Kulmann-Leal, Bruna, Ellwanger, Joel Henrique and Chies, José Artur Bogo A functional interaction between the CCR5 and CD34 molecules expressed in hematopoietic cells can support (or even promote) the development of cancer. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy* [online]. 2020, v. 42, n. 1 [Accessed 12 November 2022], pp. 70-76.

Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.htct.2019.10.001>>. Epub 30 Mar 2020. ISSN 2531-1387. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2019.10.001>.

28. Lin S, Sun L, Lyu X, Ai X, Du D, Su N, et al. Lactate-activated macrophages induced aerobic glycolysis and epithelial-mesenchymal transition in breast cancer by regulation of CCL5-CCR5 axis: a positive metabolic feedback loop. *Oncotarget*. 2017 Nov 30;8(66).
29. Che LF, Shao SF, Wang LX. Downregulation of CCR5 inhibits the proliferation and invasion of cervical cancer cells and is regulated by microRNA-107. *Exp Ther Med*. 2016 Feb;11(2):503-509. doi: 10.3892/etm.2015.2911. Epub 2015 Dec 4. PMID: 26893637; PMCID: PMC4734227.
30. Halama N, Zoernig I, Berthel A, Kahlert C, Klupp F, Suarez-Carmona M, et al. Tumoral immune cell exploitation in colorectal cancer metastases can be targeted effectively by anti-CCR5 therapy in cancer patients. *Cancer Cell*. 2016;29(4):587-601.
31. Suarez-Carmona M, Chaorentong P, Kather JN, Rothenheber R, Ahmed A, Berthel A, Heinzelmann A, Moraleda R, Valous NA, Kosaloglu Z, Eurich R, Wolf J, Grauling-Halama S, Hundemer M, Lasitschka F, Klupp F, Kahlert C, Ulrich A, Schneider M, Falk C, Jäger D, Zoernig I, Halama N. CCR5 status and metastatic progression in colorectal cancer. *Oncoimmunology*. 2019 Jul 13;8(9):e1626193. doi: 10.1080/2162402X.2019.1626193. PMID: 31428524; PMCID: PMC6685512.
32. Pervaiz, A., Ansari, S., Berger, M.R. *et al.* CCR5 blockage by maraviroc induces cytotoxic and apoptotic effects in colorectal cancer cells. *Med Oncol* 32, 158 (2015). <https://doi.org/10.1007/s12032-015-0607-x>
33. Wong MCS, Huang J, Lok V, Wang J, Fung F, Ding H, Zheng ZJ. Differences in Incidence and Mortality Trends of Colorectal Cancer Worldwide Based on Sex, Age, and Anatomic Location. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2021 May;19(5):955-966.e61. doi: 10.1016/j.cgh.2020.02.026. Epub 2020 Feb 21. PMID: 32088300.
34. Mollica Poeta Valeria, Massara Matteo, Capucetti Arianna, Bonecchi Raffaella. Chemokines and Chemokine Receptors: New Targets for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology* [Internet]. 2019;10. doi: 10.3389/fimmu.2019.00379
35. Wenbing Ying, Kesi Zheng, Yuanzhao Wu, Ouchen Wang, Pannexin 1 Mediates Gastric Cancer Cell Epithelial–Mesenchymal Transition *via* Aquaporin 5, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2021, Volume 44, Issue 8, Pages 1111-1119, Released on J-STAGE August 01, 2021, Advance online publication June 16, 2021, Online ISSN 1347-5215, Print ISSN 0918-6158, <https://doi.org/10.1248/bpb.b21-00292>, https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/44/8/44_b21-00292/_article/-char/en

36. Wang Q, Li M, Gan Y, Jiang S, Qiao J, Zhang W, Fan Y, Shen Y, Song Y, Meng Z, Yao M, Gu J, Zhang Z, Tu H. Mitochondrial Protein UQCRC1 is Oncogenic and a Potential Therapeutic Target for Pancreatic Cancer. *Theranostics*. 2020 Jan 12;10(5):2141-2157. doi: 10.7150/thno.38704. PMID: 32089737; PMCID: PMC7019160.
37. Velasquez S, Malik S, Lutz SE, Scemes E, Eugenin EA. Pannexin1 Channels Are Required for Chemokine-Mediated Migration of CD4+ T Lymphocytes: Role in Inflammation and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*. 2016 May 15;196(10):4338-47. doi: 10.4049/jimmunol.1502440. Epub 2016 Apr 13. PMID: 27076682; PMCID: PMC4918517.
38. Orellana JA, Velasquez S, Williams DW, Sáez JC, Berman JW, Eugenin EA. Pannexin1 hemichannels are critical for HIV infection of human primary CD4+ T lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology*. 2013 Mar 1;94(3):399–407.
39. HCT 116 | ATCC [Internet]. www.atcc.org. Available from: <https://www.atcc.org/products/ccl-247>.
40. abcam. Ab211091 – MTT Cell Proliferation Assay Kit [Internet]. 23 de julio de 2021. Disponible en: [https://www.abcam.com/ps/products/211/ab211091/documents/MTT-Assay-Kit-Cell-Proliferation-protocol-book-v2a-ab211091%20\(website\).pdf](https://www.abcam.com/ps/products/211/ab211091/documents/MTT-Assay-Kit-Cell-Proliferation-protocol-book-v2a-ab211091%20(website).pdf)
41. ATP LITE 300 ASSAY KIT-6016943-6016941-6016947-6016949|PerkinElmer [Internet]. www.perkinelmer.com. [cited 2022 Nov 28]. Disponible en: <https://www.perkinelmer.com/es/product/atp-lite-300-assay-kit-6016943>
42. Aaron Fierro Arenas, Marcela Hermoso Ramello, Marjorie De La Fuente. Expresión de CCR5 y PANX1 y su relación con características clinicopatológicas en cáncer de colon. [Santiago de Chile]: Universidad de Chile; 14 de enero de 2022.
43. Mecanismo de detección de la muerte celular programada con anexina V como marcador. (2005). https://www.researchgate.net/figure/Mecanismo-de-deteccion-de-la-muerte-celular-programada-con-anexina-V-como-marcador-EI_fig1_23220830
44. De la Muela David Hardisson Hernaez Milagros Choqueneira Dionisio Ana Román Guindo Francisco Javier de Santiago Garcia MPCMH, editor. Correlación entre la expresión de Ki67 con factores clásicos pronósticos y predictivos en el cáncer de mama precoz [Internet]. Vol. 27. Elsevier; 2014. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-senologia-patologia-mamaria--131-articulo-corr-elacion-entre-expresion-ki67-con-S0214158214000565>

45. Yang, K.; Xiao, Z.; He, X.; Weng, R.; Zhao, X.; Sun, T. Mechanisms of Pannexin 1 (PANX1) Channel Mechanosensitivity and Its Pathological Roles. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, **23**, 1523. <https://doi.org/10.3390/ijms23031523>
46. Cambien B, Richard-Fiardo P, Karimjee BF, Martini V, Ferrua B, Pitard B, Schmid-Antomarchi H, Schmid-Alliana A. CCL5 neutralization restricts cancer growth and potentiates the targeting of PDGFR β in colorectal carcinoma. *PLoS One.* 2011;6(12):e28842. doi: 10.1371/journal.pone.0028842. Epub 2011 Dec 20. PMID: 22205974; PMCID: PMC3243667.
47. Pervaiz, A., Zepp, M., Georges, R. *et al.* Antineoplastic effects of targeting CCR5 and its therapeutic potential for colorectal cancer liver metastasis. *J Cancer Res Clin Oncol* **147**, 73–91 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03382-9>
48. Robbins, N., Koch, S.E., Tranter, M. *et al.* The History and Future of Probenecid. *Cardiovasc Toxicol* **12**, 1–9 (2012). <https://doi.org/10.1007/s12012-011-9145-8>
49. Jiang, J.X., Penuela, S. Connexin and pannexin channels in cancer. *BMC Cell Biol* **17** (Suppl 1), S12 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12860-016-0094-8>
50. Vultaggio-Poma, Valentina, Alba Clara Sarti, and Francesco Di Virgilio. 2020. "Extracellular ATP: A Feasible Target for Cancer Therapy" *Cells* **9**, no. 11: 2496. <https://doi.org/10.3390/cells9112496>
51. Uwada, J., Mukai, S., Terada, N., Nakazawa, H., Islam, M. S., Nagai, T., ... Yazawa, T. (2021). *Pleiotropic effects of probenecid on three-dimensional cultures of prostate cancer cells. Life Sciences, 278, 119554.* doi:10.1016/j.lfs.2021.119554
52. Schneider, S. L., Ross, A. L., & Grichnik, J. M. (2014). *Do inflammatory pathways drive melanomagenesis? Experimental Dermatology, 24(2), 86–90.* doi:10.1111/exd.12502
53. Haag GM, Springfield C, Grün B, Apostolidis L, Zschäbitz S, Dietrich M, Berger AK, Weber TF, Zoernig I, Schaaf M, Waberer L, Müller DW, Al-Batran SE, Halama N, Jaeger D. Pembrolizumab and maraviroc in refractory mismatch repair proficient/microsatellite-stable metastatic colorectal cancer - The PICCASSO phase I trial. *Eur J Cancer.* 2022 May;167:112-122. doi: 10.1016/j.ejca.2022.03.017. Epub 2022 Apr 12. PMID: 35427833.

ANEXOS

Anexo N°1



Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio

Acta de Aprobación N°10/2019_CICUAL CAS UDD

Santiago, 29 de noviembre 2019

Este Comité certifica que el proyecto titulado **“Role of the chemokine receptor, CCR5, in the progression of colorectal cancer”** y el protocolo **CICUAL-UDD #10/2019** de la investigadora responsable Dra. Marjorie De la Fuente y colaboradora Dra. Lorena Lobos, cumplen con los principios bioéticos básicos del manejo y cuidado animal, considerados en la Guía de Uso y Cuidado de Animales de Experimentación¹, los principios de las 3Rs² y la Ley 20.380³ Sobre Protección de Animales.

El Comité aprobó este estudio luego de una exhaustiva revisión por parte de sus miembros y de la incorporación de las observaciones exigidas por el Comité. Las investigadoras Marjorie De la Fuente y Lorena Lobos deben mantener los procedimientos experimentales y el personal de acuerdo con el protocolo aprobado y no hacer modificaciones sin previa consulta y aprobación. El Comité otorga esta aprobación por el tiempo que dure el proyecto, el cual contempla el uso de la especie ***Mus musculus***, cepa **NOD/SCID**, con un tamaño de muestra total de **38** ejemplares adultos hembras y machos.

Este proyecto fue aprobado por el CICUAL con fecha 28 de noviembre de 2019.

Gonzalo López Gaete
Vicepresidente CICUAL
Facultad de Medicina
Clínica Alemana-Universidad del Desarrollo



1. National Research Council. 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/12910>.
2. Russell WMS, Burch RL. 1959. (as reprinted 1992). The principles of humane experimental technique. Wheathampstead (UK): Universities Federation for Animal Welfare.
3. LEY NÚM. 20.380 SOBRE PROTECCIÓN DE ANIMALES (02-AGO-2017; <http://bcn.cl/1v48d>)