



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE POSTGRADO

**“ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE GAP JUNCTIONS EN LA ACTIVACIÓN DE
LINFOCITOS T CD8⁺ MEDIANTE LA VALIDACIÓN DEL MODELO MURINO PMEL-1”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Mariela Ivonne Navarrete Sánchez

Director del Seminario de Título:

Dr. Flavio Andrés Salazar Onfray

Directora Patrocinante:

Dra. Daniela Sauma Mahaluf

Marzo 2018

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la **Srta. Mariela Ivonne Navarrete**

Sánchez

“ESTUDIOS DE LA PARTICIPACIÓN DE GAP JUNCTIONS EN LA ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T CD8⁺ MEDIANTE LA VALIDACIÓN DEL MODELO MURINO PMEL-1”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Flavio Salazar Onfray

Director Seminario de Título

Dra. Daniela Sauma Malahuf

Prof. Patrocinante del Seminario

Comisión Revisora y Evaluadora:

Dra. María Rosa Bono Merino

Presidente Comisión

Dra. Claudia Stange Klein

Evaluador

Santiago de Chile,

BIOGRAFÍA



Mariela Navarrete Sánchez nació el 14 de Febrero de 1992 en Concepción. En 1996 se mudó junto a su familia a Santiago.

Estudió desde Kinder a 7° básico en el Colegio El Encuentro de Peñalolén. Luego de eso, estudió de 8° básico a 4° medio en el Colegio Mayor de Peñalolén, donde perteneció a la selección de Danza.

En 2011 ingresó a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular de la Facultad de Ciencias en la Universidad de Chile, egresando y obteniendo el grado de licenciada en Ingeniería en Biotecnología molecular el año 2015.

El año 2015 realizó su unidad de investigación en el Laboratorio de Inmunología Antitumoral en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, para luego en 2016 realizar su Seminario de título en el mismo lugar, bajo la tutela del Dr. Flavio Salazar Onfray.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, quiero agradecer a mis padres por darme todas las oportunidades que me han brindado y por ser junto a mis hermanas el pilar del día a día. Gracias a mi familia por su apoyo incondicional y el cariño que siempre me entregan.

Gracias a todos los integrantes de los Laboratorios de Inmunología Antitumoral, Regulación e Inmunología del Cáncer e Inmunología y estrés celular de la Universidad de Chile, por la ayuda, compañía y simpatía en el quehacer científico diario. En especial, quiero agradecer al Dr. Salazar por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y brindarme lo necesario para formarme como científico.

Gracias a los chiquillos de la universidad, por tantos momentos de alegría en el apretado día a día universitario, por todo el cariño entregado cuando hacía tanto tanto sueño y por todo el mange, en especial por todo el mange.

Gracias a mis amigas del colegio (nos pasamos poh), a tengo sed 2.0 y a la Magalita, por hacer el esfuerzo de seguir siendo tan buenos amigos aún cuando nuestros caminos sean tan diferentes.

Finalmente, quiero agradecer a Ramiro, por ser un pilar fundamental durante mi experiencia universitaria y por hacerme entender que puedo lograr lo que sea que me proponga.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
Respuesta inmune antitumoral mediada por linfocitos T citotóxicos	5
Gap Junctions.....	10
Gap Junctions en el sistema inmune y la respuesta antitumoral	12
Objetivo general	19
Objetivos específicos.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
1. <u>Reactivos</u>	20
1.1 Medios de cultivo, buffers y soluciones	20
1.2 Proteínas recombinantes, péptidos inhibidores, citoquinas y <i>cell-trackers</i>	20
2. <u>Células y ratones</u>	21
2.1 Ratones.....	21
2.2 Generación <i>in vitro</i> de DCs murinas en presencia de GM-CSF.	21
2.3 Purificación de linfocitos T CD8 ⁺ de ratones pMEL-1	22
3. <u>Co-cultivos de linfocitos T CD8⁺ pMEL-1 y moDCs</u>	23
3.1 Titulación del péptido hgp100 y determinación de las condiciones de activación de LT CD8 ⁺ pMEL-1.....	23
3.2 Cinética de activación de LT CD8 ⁺ pMEL-1	24

3.3 Ensayos de activación de LT CD8 ⁺ pMEL-1 en presencia de inhibidores de GJs.....	24
4. <u>Ensayos de transferencia de calceína entre moDCs y linfocitos T CD8⁺ pMEL-1.</u>	25
5. <u>Citometría de Flujo</u>	25
5.1 Tinción Superficial.....	25
5.2 Medición de la expresión de Cx43 en células obtenidas de ratones pMEL-1 y WT mediante citometría de flujo.	26
6. <u>Softwares y análisis estadístico</u>	27
RESULTADOS	28
Medición de la expresión de Cx43 y caracterización del modelo moDC/pMEL-1	28
Titulación del péptido hgp100 ₂₅₋₃₃ y determinación de condiciones de activación mediada por moDCs de linfocitos T CD8 ⁺ pMEL-1.	32
Cinética de activación de linfocitos T CD8 ⁺ pMEL-1 mediada por moDCs.	36
moDC transfieren calceína a linfocitos T CD8 ⁺ pMEL-1 de manera antígeno específica.....	38
El péptido inhibidor mimético de Cx43, Gap 27, no inhibe el acoplamiento celular entre moDCs y LT CD8 ⁺ pMEL-1 ni la activación de LT CD8 ⁺ pMEL-1.	42
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES.....	56
BIBLIOGRAFÍA	57
ANEXO	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Anticuerpos utilizados para determinación por citometría de flujo de moléculas de superficie celular.	26
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Señales requeridas para la activación del LT mediada por DCs	8
Figura 2. Efectos pro y anti-tumorales de la GJIC heterotípica entre la célula inmune y tumor	15
Figura 3. Cx43 juega un rol en la citotoxicidad de CTL en contra de células de melanoma.....	18
Figura 4. Caracterización de células dendríticas generadas a partir de precursores de médula ósea.....	30
Figura 5. Expresión de Cx43 en linfocitos T CD8 ⁺ en modelo transgénico pMEL-1 y células dendríticas generadas a partir de precursores de médula ósea.....	31
Figura 6. Titulación del péptido hgp100 y condiciones de activación de linfocitos T CD8 ⁺ pMEL-1.....	35
Figura 7. Cinética de activación mediada por moDCs de linfocitos T CD8 ⁺ pMEL-1....	37
Figura 8. Estrategia de análisis para ensayos de transferencia de calceína entre moDC y LT CD8 ⁺ pMEL-1	40
Figura 9. Existe transferencia de calceína entre moDCs y LT CD8 ⁺ pMEL-1 en un contexto antígeno específico.....	41
Figura 10. El péptido inhibidor mimético de Cx43 Gap 27 no inhibe la transferencia de calceína entre moDCs y LT CD8 ⁺ pMEL-1.....	44
Figura 11. La inhibición de GJ-Cx43 utilizando el péptido inhibidor mimético de Cx43 Gap27 no tiene efecto en la activación mediada por moDCs de los LT CD8 ⁺ pMEL-1.	45
Figura 12. El péptido mimético de Cx43 Gap 27 no inhibe la transferencia de calceína entre células HEK-293	47
Figura 13. El péptido mimético de Cx43 Gap 27 no inhibe la transferencia de calceína entre moDC y LT CD4 ⁺ OT-II	48

LISTA DE ABREVIATURAS

APC: Célula presentadora de antígenos.

BCR: Receptor de Linfocitos B

CTL: Linfocito T citotóxico

CD: Cluster de diferenciación

Cxs: Conexinas

Cx43: Conexina 43

DAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Daño

DC: Célula dendrítica

GJ: Gap Junction

GJIC: Comunicación Intercelular Mediada por Gap Junctions

GM-CSF: Factor de Estimulación de colonias monocíticas y granulocíticas

GMZs: Granzimas

HCs: Hemicanales

ICAM: Molécula de adhesión intercelular

IL-2: Interleuquina 2

IFN- γ : Interferón gama

kDa: KiloDalton

LB: Linfocitos B

LPS: Lipopolisacárido

LT: Linfocitos T

MFI: Intensidad Media de Fluorescencia

MHC-I: Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase I

MHC-II: Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase II

moDC: Célula dendrítica

mRNA: RNA mensajero

NK: Célula Natural Killer

PAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos

PBS: Tampón Fosfato Salino

pMEL-1: Proteína de Premelanosoma 1

PRF: Perforina

PRR: Receptor de Reconocimiento de Patrones

SEM: Error Estándar de la Media

SFB: Suero Fetal Bovino

SI: Sinapsis inmunológica

siRNA: ARN pequeño de interferencia

TCR: Receptor de Linfocitos T

TNF: Factor Necrótico Tumoral

WT: Wild Type

RESUMEN

Las Gap Junctions (GJs) son clústers de canales intercelulares localizados en la membrana plasmática que permiten la comunicación directa entre células adyacentes. Cada canal GJ está compuesto por 2 hemicanales hexaméricos conocidos como conexones, los cuales a su vez están compuestos por seis proteínas de transmembrana llamadas conexinas (Cxs), siendo Cx43 la más representada en el sistema inmune. Se ha vinculado la variación de los niveles normales de expresión de las Cxs con la patogénesis de distintas enfermedades, incluyendo sordera congénita, arritmias cardíacas y cáncer. Dentro de esta última nuestro laboratorio ha desarrollado proyectos de investigación que permitan determinar el papel de las GJs en la respuesta inmune antitumoral. Por ejemplo, publicaciones previas de nuestro laboratorio han demostrado que Cx43 participa en la transferencia directa de antígenos tumorales entre células dendríticas (DCs). Así mismo, Cx43 polariza hacia la sinapsis entre DC y linfocitos T (LT) CD4⁺, formando canales funcionales que permiten una comunicación bidireccional requerida para la activación de LT mediada por APC. Además, se ha encontrado que Cx43 juega un rol en la activación de células *natural killer* (NK) por parte de DCs y en la regulación de la citotoxicidad de las células NK contra células tumorales. Así mismo, resultados no publicados indican que Cx43 polariza hacia el sitio de contacto entre LT CD8⁺ citotóxicos (CTLs) y células de melanoma, sugiriendo que Cx43 participaría en la citotoxicidad de CTLs en contra de éstas. Estos antecedentes sugieren que las GJs podría participar en el transporte de moléculas o señales que se encuentren involucradas en el proceso de activación de LT CD8⁺ mediada por DCs, tema que aún no ha sido estudiado por las investigaciones actuales. En estudios

anteriores nuestro laboratorio ha trabajado con modelos celulares humanos, sin embargo, dado que la obtención de LT vírgenes específicos contra el tumor a partir de donantes sanos es improbable y engorroso, en este trabajo decidimos utilizar el modelo murino específico para melanoma pMEL-1 y validar y optimizar su utilización para estudios de la participación de las GJs en la activación de LT CD8⁺ por parte de DCs. Nuestros resultados indican que el modelo pMEL-1 no representa alteraciones en la expresión de Cx43 respecto a su contraparte silvestre (*wild type* (WT)), y que es un modelo muy sensible, encontrando expresión del marcador de activación CD69 incluso desde 1 hora post co-cultivo. Además, se determinó que existe transferencia de calceína entre moDC y LT CD8⁺ pMEL-1 en un contexto estrictamente antígeno específico. Sin embargo, no pudimos dilucidar si las GJs participan del proceso de activación ya que el método de inhibición utilizado, el cual es un péptido mimético de Cx43, presentó problemas técnicos de funcionamiento, fenómeno que fue comprobado en modelos donde anteriormente se había determinado la comunicación mediada por GJs. Proponemos en el futuro utilizar otros métodos de inhibición, como el uso de siRNA contra Cx43, para determinar si estos canales juegan un rol en este proceso.

ABSTRACT

Gap Junctions are clusters of intercellular channels located in the plasma membrane that allow direct communication between adjacent cells. Each GJ channel is composed of 2 hexameric hemichannels known as connexions, which are composed by six transmembrane proteins called connexins (Cxs), being Cx43 the most represented one in the immune system. Variation in normal expression levels on Cxs have been linked to the development of different diseases, including congenital deafness, cardiac arrhythmias and cancer, being the last the one where our laboratory has developed investigation lines that allow to determine the role of GJs in the antitumoral response. In example, previous publications of our group have demonstrated that Cx43 participates in the direct transfer of tumoral antigens between dendritic cells (DCs) and that polarizes to the synapsis between DCs and CD4⁺ T lymphocytes, forming functional channels that allow bidirectional communication required for the DCs mediated activation of LT. Besides this, we have found that Cx43 plays a role in the activation of natural killer (NK) cells mediated by DCs, and in the regulation of the cytotoxicity of NK cells against tumor cells. Likewise, unpublished data indicate that Cx43 polarizes to the contact site between cytotoxic CD8⁺ T cells (CTLs) and melanoma cells, suggesting that Cx43 participates in the cytotoxicity of these cells. These backgrounds suggest that GJs may participate in the transport of molecules or signals that may be involved in the process of DC mediated activation of CD8⁺ T cells, subject that hasn't been studied by the actual investigations. In previous studies our group has worked with human cellular models, however, given that obtaining naïve T cells from healthy donors is unlikely and difficult, in this work we decided to use the melanoma specific murine model pMEL-1 and valid and optimize it's use for studies of the participation of GJs in the DCs

activation of T cells. Our results indicate that the pMEL-1 model doesn't have alterations in the Cx43 expression levels compared with the wild type background and that it is a very sensible model, in which we can evaluate the activation of T cells even an hour after co-culture. Besides, it was determined the existence of calcein transfer between moDCs and CD8⁺ pMEL-1 T cells in a strictly antigen specific context. However, we could not elucidate if the GJs participate or not in the CD8⁺ T cell activation process, as our inhibition method, which is a Cx43 mimetic peptide, presented technical problems, phenomenon that was proven in models where GJ mediated communication has previously been determinate. We propose in the future to use a different inhibition method, as the use of anti-Cx43 siRNA, in order to determine if these channels play a role in this process.

INTRODUCCIÓN

Respuesta inmune antitumoral mediada por linfocitos T citotóxicos

El sistema inmune es un sistema multicelular altamente organizado que permite la protección del individuo ante agentes patógenos y células malignas, con el fin de mantener la homeostasis del organismo (Parkin y Cohen 2001). Éste se puede clasificar en dos subcategorías: innato y adaptable. El sistema inmune innato corresponde a la primera línea de defensa del organismo, jugando un rol fundamental en la generación de una respuesta inflamatoria rápida ante la invasión de patógenos. Está compuesto principalmente por células fagocíticas como macrófagos y granulocitos y células presentadoras de antígenos (APCs, *Antigen Presenting Cells*), tales como las células dendríticas (DC, *Dendritic Cells*). Estas células expresan receptores, evolutivamente conservados, llamados PRR (*Pattern Recognition Receptors*). Estos receptores son capaces de reconocer estructuras moleculares presentes en prácticamente todos los microorganismos y virus conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*), las cuales son normalmente esenciales para la sobrevivencia del patógeno y claramente distinguibles de “lo propio”. Sin embargo, los PRRs también pueden reconocer factores “propios” asociados a daño, llamados DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*), cuando se encuentran en lugares aberrantes o anormales, consecuencia de una infección, inflamación o estrés celular (Mogensen, 2009).

Por otro lado, el sistema inmune adaptable es responsable de la eliminación del patógeno de manera específica. La respuesta inmune adaptable es más lenta que la innata y genera memoria inmunológica. Esta respuesta se encuentra mediada principalmente por linfocitos T (LT) y B (LB), los cuales poseen receptores antígeno

específicos llamados TCR (*T cell receptor*) y BCR (*B Cell Receptor*), respectivamente. Estos receptores son codificados por genes ensamblados por recombinación somática, dando lugar a millones de receptores diferentes con especificidad para distintos antígenos (Chaplin, 2010). Los linfocitos T pueden dividirse en dos grupos dependiendo del correceptor que expresan junto al TCR: linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺. Los linfocitos T CD4⁺ o T *helper* reconocen antígenos presentados en moléculas de histocompatibilidad (MHC, *Major Histocompatibility Complex*) de clase II y regulan la actividad de otras células del sistema inmune mediante la secreción de citoquinas (Abbas y cols. 2012). Por otra parte, los linfocitos T CD8⁺ reconocen antígenos presentados en MHC de clase I (Mellman y Steinman, 2001) y tienen la capacidad de eliminar directamente células blanco, mediante su acción citotóxica. Junto con las células NK, los linfocitos T CD8⁺ son las principales células efectoras en la respuesta inmunológica antitumoral (Gajewski y cols. 2013).

Los linfocitos T requieren para su activación inicial o *priming* de la presentación de antígenos por parte de una APC profesional. Dentro de las APCs, las DCs son las más eficientes en la activación de linfocitos T vírgenes (Steinman, 2007). En el contexto de una respuesta inmunológica antitumoral, las DCs, que se encuentran en tejidos periféricos, al encontrar al tumor, reconocerán los DAMPs que se encuentren en la superficie de las células tumorales o que sean liberados por éstas al medio extracelular a través de sus receptores PRRs de membrana (Cantrell, 2015). Gracias a los "*eat-me signals*" expresados en la membrana de células tumorales apoptóticas, las cuales son señales pro-fagocíticas (Li, 2012), las DCs fagocitarán las células y procesarán los antígenos tumorales, los cuales luego serán presentados en moléculas de MHC. Luego, las DCs adquieren la capacidad de migrar hacia el linfonodo más cercano, donde activarán linfocitos T vírgenes específicos para dicho antígeno.

Para activarse, los LT requieren de 3 señales: 1) La señal de reconocimiento antigénico dada gracias a la unión de los TCR de los LT con los complejos MHC-péptido (pMHC) de las DCs; 2) la señal de coestimulación dada por la interacción de moléculas coestimuladoras expresadas en la membrana de las APCs y los LT y 3) la acción de citoquinas producidas por APCs, siendo ésta una señal de diferenciación (Figura 1) (Babbit y cols., 1985; Skipkova & Wieland, 2012; Abbas, 2012; Cantrell, 2015). A nivel molecular, esta interacción LT/DC depende de una estructura organizada conocida como la sinapsis inmunológica (SI) la cual es esencial para la activación y proliferación de los LT (Grakoui, 1999). Estas tres señales provocan en los LT un aumento rápido y sostenido de Ca^{+2} intracelular, que induce la activación de varias vías de transducción de señales necesarias para la transcripción de genes que promueven la supervivencia, proliferación, aumento de la actividad metabólica y diferenciación de éstos (Abbas y cols. 2012; Lewis y cols. 2001).

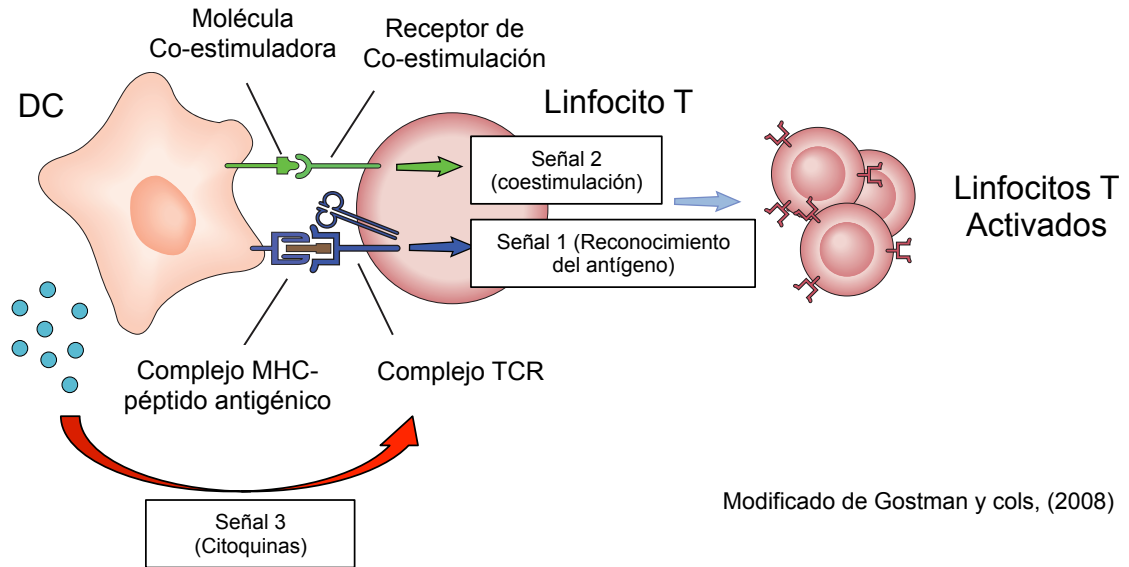


Figura 1. Señales requeridas para la activación del LT mediada por DCs. La activación de linfocitos por parte de DCs requiere de 3 señales: la señal dada por la unión de los TCR/pMHC, la coestimulación, dada por la unión de moléculas co-estimuladoras presentes en las DCs con sus receptores presentes en los LT y finalmente la acción de citoquinas producidas por las DCs. En conjunto, estas tres señales llevarán a la activación de vías de señalización necesarias para la proliferación y activación linfocitaria.

Una vez activados, los LT CD8⁺ adquieren la capacidad de eliminar las células tumorales, por lo que son llamados LT efectores o citotóxicos (*Cytotoxic T Lymphocytes*). Una vez en el nicho tumoral, los CTLs reconocerán antígenos tumorales presentados en MCH-I en la superficie de las células tumorales por medio de su TCR y ejercerán su acción citotóxica sobre ellas, con el fin de eliminarlas (Andersen y cols. 2005; Abbas y cols. 2012).

A pesar de requerir diferentes señales moleculares para ser activados, los CTLs y las células NK poseen los mismos mecanismos básicos para destruir células blanco: 1) exocitosis de gránulos citotóxicos, 2) interacción ligando-receptor de muerte y 3) liberación de citoquinas citotóxicas como TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) e interferón γ (IFN- γ) (Andersen y cols. 2006). Estos mecanismos provocan en la célula blanco eventos intracelulares programados que llevan, en la mayoría de los casos, a una muerte apoptótica, con la excepción de IFN- γ que induce la activación transcripcional de MHC-I y receptores de muerte como Fas en las células blanco, llevando a un aumento en la presentación de antígenos y la lisis mediada por Fas (Andersen y cols. 2006). La vía de exocitosis de gránulos citotóxicos, requiere contacto célula-célula y dirige estos gránulos previamente sintetizados y contenidos en los LT CD8⁺ o NK hacia el sitio de contacto con la célula blanco, también llamado SI citotóxica (Andersen y cols. 2006; Martínez-Lostao y cols., 2015). En la SI citotóxica, una de las proteínas contenidas en los gránulos citotóxicos, llamada perforina (PRF) forma poros en la membrana de la célula blanco, permitiendo que las granzimas (GZMs), las cuales son miembros de la familia de las serina proteasas, entren al citoplasma de la célula blanco, donde escinden sustratos críticos para el control de la muerte celular (Martínez-Lostao y cols., 2015). Por otra parte, los ligandos de muerte son proteínas expresadas por las células citotóxicas que se unen a receptores de muerte de la superfamilia del

TNF y tienen la capacidad de gatillar la eliminación de la célula blanco mediante la activación de la vía apoptótica intrínseca o extrínseca (Martínez-Lostao y cols., 2015). De esta manera, los CTLs monitorean el cuerpo en busca de células tumorales, listas para destruirlas, con el fin de eliminar el tumor y mantener la homeostásis (Abbas y cols. 2012).

Ambos procesos, tanto de activación de LT mediada por DCs, como la eliminación de células tumorales por parte de CTL, son procesos que requieren contacto célula a célula y que involucran una SI. Además de las moléculas ya mencionadas, en la SI encontramos otras proteínas y moléculas que podrían jugar un rol en la comunicación y contacto célula-célula. Una de ellas son las conexinas, las cuales forman canales llamados Gap Junctions (GJs) y que han sido de interés en nuestro laboratorio ya que sus alteraciones se han vinculado con el desarrollo de diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer, tema central de nuestras investigaciones.

Gap Junctions

Las GJs o uniones en hendidura son canales intercelulares localizados en la membrana plasmática que permiten la comunicación directa entre células adyacentes. Cada canal GJ está compuesto por 2 hemicanales hexaméricos conocidos como conexones o hemicanales (HCs), los cuales a su vez están compuestos por seis proteínas de transmembrana llamadas conexinas (Cxs) (Nielsen y cols., 2012). La familia de genes de las conexinas está compuesta por 21 miembros en humanos y 20 miembros en ratón, donde las distintas isoformas son nombradas generalmente según su peso molecular predicho, difiriendo en sus propiedades de masa y carga (Neijssen et al, 2007). Cada hemicanal puede estar formado por una o varias isoformas de

conexina, dando lugar a un canal homomérico o heteromérico, respectivamente, determinando en parte tanto la permeabilidad como las características regulatorias del canal (Nielsen y cols., 2012). Una vez formada la GJ funcional, esta permite el intercambio de moléculas pequeñas de hasta ~1.4 nm entre el citoplasma de células adyacentes o con el medio extracelular por medio de HCs, dentro de las que se incluye ATP, cAMP, UDP, cGAMP, IP₃, Ca⁺², PGE₂, cADPR, glutamato, miRNAs y péptidos pequeños (Sáez y cols., 2014).

Se ha demostrado que la comunicación mediada por estos canales es crítica en importantes procesos celulares y fisiológicos, tales como la propagación de la corriente eléctrica en neuronas y tejido cardíaco (Zsiros y cols., 2007; Veeraraghavan y cols., 2014), mantención de la homeostásis tisular (Chanson y cols., 2005), control de la proliferación, diferenciación y muerte celular (Krysko y cols., 2005; Carette y cols., 2014), desarrollo embrionario (Kotini y Mayor, 2015) y la respuesta inmune (Glass y cols., 2015), entre otras. La mayoría de las isoformas de conexina se expresan estrictamente de forma tejido y tiempo específica, mientras que Cx43 se expresa ubicuamente, siendo la más representada en las células del sistema inmune (Oviedo-Orta y cols (2004); Neijssen y cols, 2007). Se ha vinculado la variación en los niveles normales de conexinas o la pérdida de funcionalidad de los canales que conforman, con el desarrollo de distintas enfermedades, incluyendo la sordera congénita (Wingard y Zhao, 2015), arritmias cardíacas (Delmar y Makita, 2012), cataratas (Pichi y cols., 2016), isquemia (Cascio y cols., 2005) y cáncer (Aason et al, 2016). Dentro de ésta última patología, se ha observado frecuentemente una reducción o pérdida completa de la expresión de conexinas en las células tumorales, donde el nivel de variación y el tipo de conexina varía según el tipo y etapa del tumor (Kandouz M. y Batist G., 2010), sustentando el concepto de que las conexinas serían supresores de tumor. Sin

embargo, publicaciones recientes indican que esto sería un hecho relativo, ya que dependiendo del tipo y etapa del tumor, se ha encontrado que distintas isoformas de conexina estarían involucradas también en la progresión tumoral (Gleisner y cols., 2017), llevando a que éstas sean consideradas supresores de tumores condicionales. Debido a esto, la regulación de la expresión y funcionalidad de las conexinas, en especial Cx43, ha sido propuesto como un posible blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer (Kandouz M. y Batist G., 2010; Gleisner y cols., 2017).

En este contexto, nuestro laboratorio ha desarrollado proyectos de investigación que permiten determinar el papel de las comunicaciones intercelulares mediadas por gap junctions (GJIC, *Gap Junctions Intercellular Communications*) dentro de las funciones del sistema inmune y su relación con la respuesta inmune antitumoral (Mendoza-Naranjo y cols., 2007; Mendoza-Naranjo y cols, 2011; Tittarelli y cols., 2014; Tittarelli y cols, 2015; Gleisner y cols., 2017).

Gap Junctions en el sistema inmune y la respuesta antitumoral

Diferentes publicaciones describen la participación de las GJ en la comunicación entre células del sistema inmune y modulación de distintos procesos inmune. Por ejemplo, se ha demostrado que Cx43 polariza a la SI entre DC y LT CD4⁺ formando canales funcionales y permitiendo una comunicación bidireccional entre éstas células. La inhibición de estos canales reduce la activación de los linfocitos mediante un mecanismo mediado por la disminución de las ondas de Ca⁺² necesaria para la activación de los LT (Elgueta y cols., 2009; Mendoza-Naranjo y cols., 2011). Asimismo, se ha descrito que los LT reguladores, los cuales son una población de linfocitos T capaces de modular el sistema inmune y mantener la tolerancia, ejercen su función reguladora a través de la transferencia de cAMP vía GJ. Este mensajero inhibe

la producción de IL-2 en linfocitos T efectores, inhibiendo el crecimiento, diferenciación y proliferación de éstos (Bopp y cols., 2007). Además de permitir la transferencia de moléculas entre células, se ha descrito que bajo condiciones fisiológicas hemicanales de Cx43 son capaces de liberar moléculas de señalización al medio extracelular, incluyendo NAD⁺, glutamato y ATP. El ATP y sus derivados son segundos mensajeros importantes en la activación de receptores purinérgicos, los cuales se han implicado en la activación de diferentes tipos celulares del sistema inmune, como por ejemplo, en la activación celular por la entrada de calcio, en la quimiotaxis de neutrófilos/macrófagos, y en la amplificación de señales en los linfocitos T, lo cual lo hace un segundo mensajero de interés para estudios que vinculan a las GJs-Cx43 con los distintos procesos inmunes (Junger, 2011).

Publicaciones previas de nuestro laboratorio han demostrado que las GJ también participan en diferentes procesos inmune relacionados con la respuesta antitumoral. Por ejemplo, se ha visto que las GJ participan en la transferencia directa de antígenos tumorales entre DCs y en la presentación cruzada de estos antígenos, permitiendo una efectiva activación de linfocitos T CD4⁺ (Figura 2; punto 7) (Mendoza-Naranjo y cols., 2011). Luego, se estudió el papel de Cx43 en la función efectora de células NK contra células de melanoma. Se determinó que las GJ formadas por Cx43 polarizan hacia la zona de contacto entre células NK y DCs permitiendo la comunicación bidireccional entre estas células. La inhibición de Cx43 llevó a una disminución de la activación de las células NK determinado por una baja expresión de moléculas de activación y liberación de IFN- γ , sin afectar el fenotipo de las DCs. Además, se identificó que Cx43 se acumula en el sitio de contacto entre células NK y células tumorales, regulando la citotoxicidad de las primeras mediante la regulación de un eficiente flujo de calcio en la célula blanco que contribuye a la actividad de granzima

B llevando a la muerte celular programada (Figura 2; puntos 8 y 10) (Tittarelli y cols., 2014). En un estudio posterior, se analizó el papel de Cx43 en la tumorigenicidad *in vivo* de células de melanoma. Este trabajo demostró que la sobreexpresión de Cx43 en líneas de melanoma disminuye su crecimiento por un mecanismo dependiente de apoptosis y reduce su capacidad metastásica. Esto sugiere el potencial uso de compuestos que aumenten selectivamente la expresión de Cx43 en las células de melanoma como nuevos tratamientos para esta enfermedad (Tittarelli y cols., 2015). Finalmente, estudios no publicados de nuestro laboratorio sugieren que Cx43 polariza hacia el sitio de interacción entre CTLs y células tumorales de manera antígeno específica, formando GJ funcionales que contribuyen a la actividad citotóxica de éstos (Figura 3).

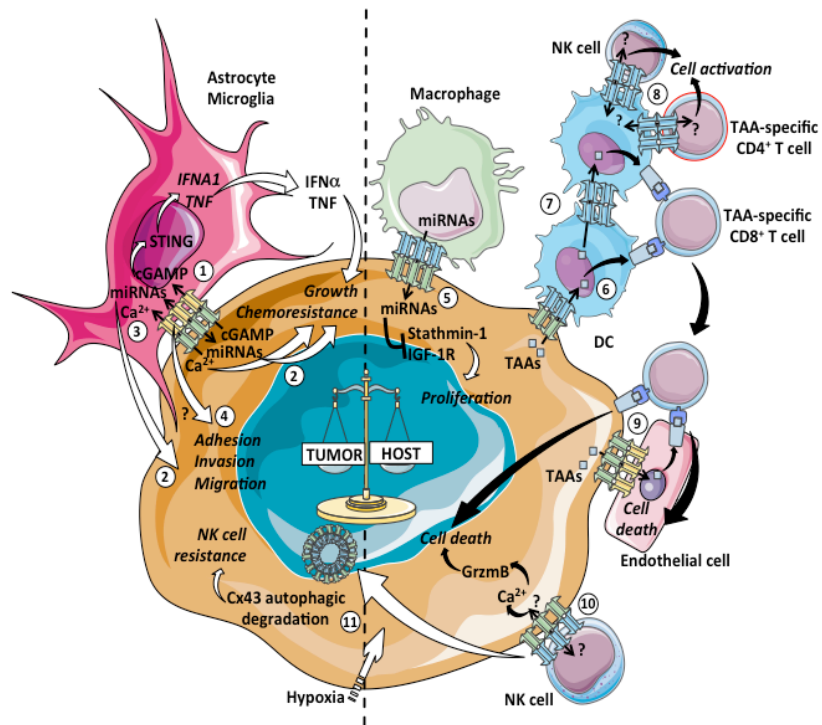


Figura 2. Efectos pro y anti-tumorales de la GJIC heterotípica entre la célula inmune y tumor. La comunicación mediada por GJ entre células tumorales y células inmune puede llevar a efectos o consecuencias pro-tumorales (izquierda: 1-4; 11) o anti-tumorales (derecha: 5-10). 1: la interacción carcinoma-astrocitos promueve la metástasis cerebral de cáncer de mamas mediante el transporte de cGAMP desde células tumorales hacia astrocitos *vía* GJs-Cx43, promoviendo el crecimiento y quimioresistencia de las células tumorales. 2: microRNAs (miRNAs) transferidos por GJs entre astrocitos de ratón y células tumorales de pulmón humanas provee un aumento de la resistencia de las últimas a la quimioterapia. 3: astrocitos reducen la apoptosis en células de melanoma tratadas con drogas quimioterapéuticas mediante el secuestro de Ca^{2+} intracelular *vía* GJICs. 4: GJICs entre células de glioblastoma y astrocitos contribuyen a la adhesión, migración e invasión de células tumorales al parénquima cerebral. 5: la transferencia de miRNAs mediada por GJs desde macrófagos a una línea celular de hepatocarcinoma, inhibe la proliferación de estas células tumorales. 6: la expresión de Cx43 en células de melanoma permite la transferencia de antígenos asociados a tumor (TAA) pre-procesados desde células de melanoma a DCs 7: GJ-Cx43 participan en la transferencia de antígenos de melanoma entre DCs humanas y la presentación cruzada de éstos 8: GJs-Cx43 se acumulan en la SI formada entre DCs y LT CD4⁺ melanoma específicos y células NK, contribuyendo a la activación de dichas células. 9: GJs-Cx43 permiten el paso de antígenos asociados a tumor desde células de melanoma a células endoteliales autologas 10: GJs-Cx43 se contribuyen a la citotoxicidad de células NK 11: La activación de la autofagia en células de melanoma hipóxicas causa la degradación selectiva de GJs-Cx43, perjudicando la lisis de células de melanoma mediada por células NK. Figura tomada de Gleisner y cols., 2017.

Estos antecedentes sugieren en conjunto, una participación de las GJ en el transporte de moléculas o señales que participen en el proceso de activación de linfocitos T CD8⁺ mediada por DCs y en la fase efectora de éstos, tema que aun no ha sido estudiado. En estudios anteriores, nuestro laboratorio ha trabajado con modelos celulares humanos que han permitido determinar la participación de las GJs en la activación y citotoxicidad de células NK (Tittarelli, 2014) y en la citotoxicidad de linfocitos T CD8⁺ contra células de melanoma (no publicado) (Lillo F., 2015). Sin embargo, dicho modelo no permite estudiar el papel de estos canales en el proceso de activación de linfocitos T CD8⁺, ya que la obtención de linfocitos T vírgenes específicos para un antígeno asociado a melanoma a partir de sangre periférica de donantes sanos es técnicamente poco factible. Es por esto que decidimos utilizar el modelo murino transgénico específico para melanoma pMEL-1. Los ratones pMEL-1 son animales transgénicos con *background* en la cepa C57BL/6, en el cual los linfocitos T CD8⁺ expresan el TCR transgénico V α 1V β 13 que reconoce específicamente el péptido mgp100₂₅₋₃₃, homólogo murino de la proteína premelanosomal humana PMEL o hgp100. Cerca del 20% de los esplenocitos totales de estos ratones son LT CD8⁺ y >95% de éstos son V β 13⁺ (Overwijk y cols., 2003). Estos linfocitos son capaces de reconocer la línea de melanoma murino B16-F10, la cual expresa la proteína mgp100 y activarse en presencia del antígeno peptídico derivado de la proteína PMEL o gp100 humana hgp100₂₅₋₃₃, incluso con mayor eficiencia que en presencia del antígeno murino. Una vez purificados por selección negativa, sobre el 90% de los LT son CD8⁺, donde virtualmente todos (>95%) son V β 13⁺ (Overwijk y cols., 2003).

Es por esto que en este trabajo, proponemos validar el modelo murino transgénico PMEL, para el estudio de la participación de GJs en la activación mediada por DCs de LT CD8⁺, con el objetivo final de dilucidar en experimentos posteriores el

mecanismo de acción de las GJ en éste proceso y entender su papel en la regulación de la respuesta inmune antitumoral mediada por CTLs.

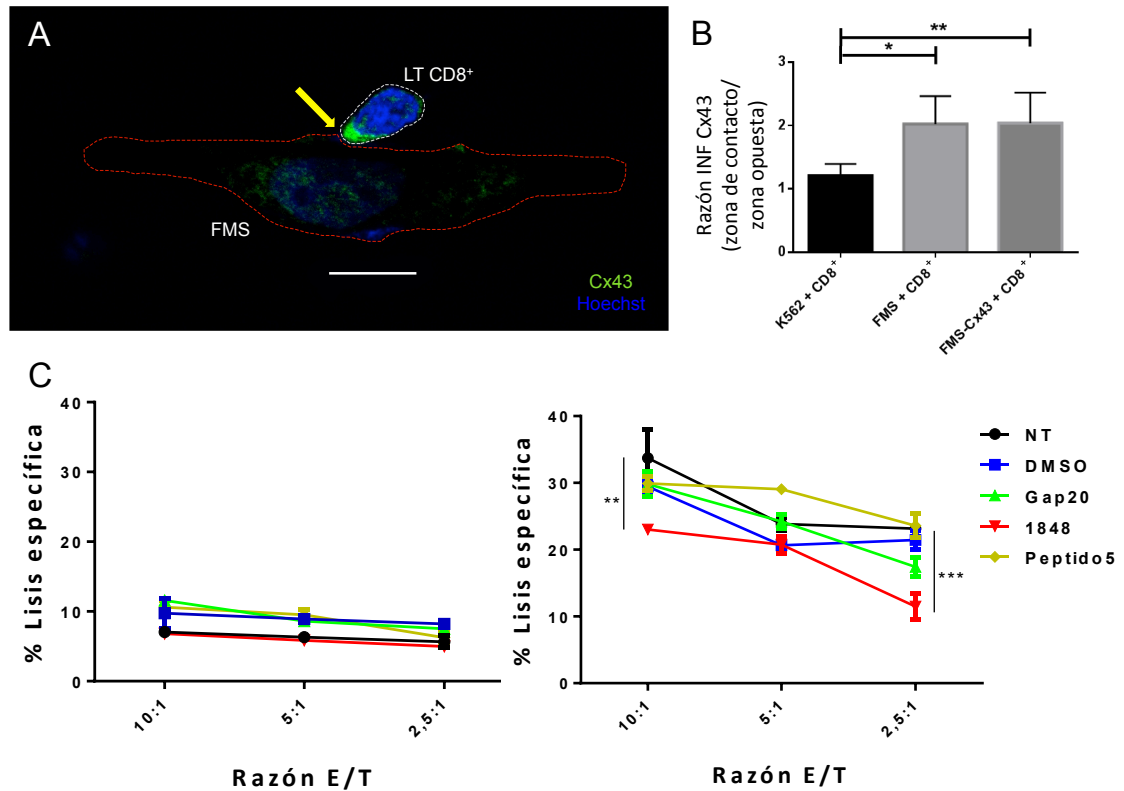


Figura 3. Cx43 juega un rol en la citotoxicidad de CTL en contra de células de melanoma. A) Conexina 43 polariza hacia la sinapsis citolítica entre LT CD8⁺ anti-Mart1 y células de la línea celular de melanoma FMS de forma antígeno específica. El sitio de contacto está indicado con una flecha amarilla. Barra de escala: 10 μ m. **B)** Gráfico de barras que muestra la razón de la IMF en el sitio de contacto entre las células y el sitio opuesto de éstas. Como control de especificidad se utilizaron células K562, una línea de linfoma Mart-1⁻. También se utilizó la línea FMS-Cx43, una línea de melanoma transfectada que sobreexpresa Cx43. $p < 0,05$. **C)** La inhibición de GJ-Cx43 disminuye la citotoxicidad de LT CD8⁺ en contra de células de melanoma. Gráficos que muestran el porcentaje de lisis específica de FMS (izquierda) y FMS-Cx43 (derecha) en ensayos de liberación de cromo-51. FMS-Cx43 tiene una lisis específica mayor en todas las condiciones. DMSO: control de vehículo; Gap 20: péptido control; 1848: péptido mimético de Cx43; péptido 5: péptido bloqueador de hemicanales. $p < 0,05$. N=3.

Hipótesis

Las comunicaciones intercelulares dependientes de canales Gap Junctions participan en la activación de linfocitos T CD8⁺ mediada por células dendríticas en la respuesta inmune antitumoral.

Objetivo general

Estudiar la participación de las comunicaciones mediadas por Gap Junctions en la activación de linfocitos T CD8⁺ por parte de células dendríticas.

Objetivos específicos

- 1.** Validar y optimizar el uso del modelo murino transgénico pMEL-1 para su utilización en estudios de la participación de Gap Junctions en la activación de linfocitos T CD8⁺.
- 2.** Determinar la formación de Gap Junctions funcionales entre células dendríticas derivadas de médula ósea y linfocitos T CD8⁺ del ratón transgénico pMEL-1.
- 3.** Estudiar la participación de las comunicaciones tipo Gap Junctions en la activación de linfocitos T CD8⁺ del ratón transgénico pMEL-1 por parte de células dendríticas derivadas de médula ósea.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

1.1 Medios de cultivo, buffers y soluciones

Para el cultivo de LT y co-cultivos de DC-LT se utilizó medio RPMI 1640 (Corning) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) (Corning) descomplementado, 100 U/mL Penicilina (Hyclone, GE Healthcare) y 100 mg/mL Estreptomicina (Hyclone, GE Healthcare). El medio de cultivo utilizado para la generación de DCs derivadas de médula ósea (moDC) fue RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco, ThermoFisher Scientific), suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) (Hyclone, GE Healthcare) descomplementado, 100 U/mL Penicilina (Hyclone, GE Healthcare), 100 mg/mL Estreptomicina (Hyclone, GE Healthcare) y 50 mM de β -mercaptoetanol (Gibco, ThermoFisher Scientific), el cual se denominó R10. Para la preparación de soluciones se utilizó el buffer salino PBS 1X pH 7.4 (Gibco, ThermoFisher Scientific). Para la lisis de glóbulos rojos se utilizó buffer de lisis *Red Blood Cell* (RBC) (Biolegend). Para la purificación de linfocitos T CD8⁺ se utilizó *Magnetic-activated cell sorting* buffer (MACS buffer) el cual consiste en PBS 1X pH 7.4 suplementado con 0,5% de SFB y 2 mM de EDTA (Ambion, Thermo Scientific). Para tinciones con anticuerpos se utilizó *Fluorescence-Activated Cell Sorting* Buffer (FACS Buffer) el cual consiste de PBS 1X (Gibco, ThermoFisher Scientific) suplementado con 2% SFB (Corning).

1.2 Proteínas recombinantes, péptidos inhibidores, citoquinas y *cell-trackers*

El péptido de la proteína gp100 humana (hgp100₂₅₋₃₃) fue sintetizado por ChinaPeptides Co. El péptido de la proteína ovoalbúmina SIINFEKL fue gentilmente facilitado por la Dra. Fabiola Osorio, Laboratorio de Inmunología y Estrés Celular,

Facultad de Medicina, Universidad de Chile. La citoquina recombinante GM-CSF murina fue obtenida de Miltenyi Biotec. El péptido inhibidor de Cx43 utilizado fue Gap 27 (Secuencia: SRPTEKTIFII, 98% pureza, ChinaPeptides) mientras que el péptido control fue el *Scramble* de Gap 27 (Secuencia: TFEPIRISITK, 98% pureza, ChinaPeptides). Ambos fueron disueltos en PBS 1X a una concentración stock de 30 mM y utilizados a una concentración final de 300 nM. El inhibidor químico de GJs Carbenoxolona fue adquirido de Sigma Aldrich y resuspendido en PBS 1X a una concentración stock de 50 mM, para luego ser utilizada a una concentración final de 50 nM. El CellTracker™ Violet BMQC se obtuvo de Life Technologies y se utilizó a una concentración final 2.5 mM para tinción de Linfocitos T. El colorante Calceina-AM (Invitrogen) fue re-suspendido en DMSO a una concentración stock de 1 mM y se utilizó a una concentración final 0.7 mM.

2. Células y ratones

2.1 Ratones

Ratones C57BL/6 *Wild Type* (WT) de entre 6-8 semanas de edad y ratones pMEL-1 (Overwijk, 2003) de entre 6-12 semanas de edad fueron obtenidos del Bioterio central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El manejo y los procedimientos experimentales en animales durante este trabajo de seminario de título se realizaron de acuerdo a los protocolos de bioética correspondientes a la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

2.2 Generación *in vitro* de DCs murinas en presencia de GM-CSF.

Se aislaron fémures y tibias de ratones C57BL/6 y se esterilizaron por 1 minuto en etanol 75%. Luego, se lavaron con PBS y se perfundieron con R10 utilizando una

jeringa de tuberculina de 1 mL (BD) para obtener la médula, hasta que los huesos se encontraron blancos. La suspensión celular fue filtrada utilizando un *cell strainer* de poro 70 μm (Falcon®, BD) para luego ser centrifugados en tubos de 15 mL (Falcon®, BD) a 400 g por 7 minutos a 4 °C. Luego de descartar el sobrenadante, el pellet celular se resuspendió en 1 mL de buffer de lisis RBC 1X y se incubó en hielo por 1 minuto, agitando cuidadosamente cada 20 segundos. Luego, se diluyó el buffer RBC hasta 1:9 utilizando PBS 1X y se centrifugó a la velocidad anteriormente mencionada. Se descartó el sobrenadante y el pellet celular obtenido se resuspendió en 5 mL de medio R10. Las células fueron contadas utilizando una cámara de Neubauer y azul de tripán para determinar su viabilidad. Se llevaron a una concentración de 3×10^5 células/mL y se plaquearon 10 mL de la suspensión celular en una placa de 100x15 mm (Falcon®, BD), suplementando el medio de cultivo con 20 ng/mL de la citoquina recombinante murina GM-CSF (Miltenyi Biotec) (Lutz y cols., 1990). Al día 3 de cultivo, las células fueron alimentadas con 10 mL de R10 suplementado con 20 ng/mL de mGM-CSF. Al día 6 de cultivo se realizó un cambio de medio, el cual consiste en recolectar 10 mL del cultivo celular, centrifugar a la velocidad y condiciones antes mencionadas y luego resuspender el pellet celular obtenido en 10 mL de R10 suplementado con 20 ng/mL de mGM-CSF, para luego ser devueltas a la placa de cultivo. Luego las células se mantuvieron por 8-9 días a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂.

2.3 Purificación de linfocitos T CD8⁺ de ratones pMEL-1

Se obtuvieron esplenocitos totales del bazo de ratones pMEL-1 mediante perfusión con medio R10 utilizando una jeringa de tuberculina de 1 mL (BD). La suspensión celular obtenida fue filtrada utilizando un *cell strainer* de poro 70 μm (Falcon®, BD), para luego ser centrifugada a 400 g por 7 minutos a 4°C. Una vez descartado el sobrenadante, el

pellet celular se resuspendió en 1 mL de buffer de lisis RBC 1X y se incubó a 4°C por 5 minutos, agitando cada 1 minuto. Se diluyó el buffer de lisis RBC 1:9 con medio R10 y se centrifugó utilizando las condiciones anteriormente mencionadas. Las células fueron contadas utilizando una cámara de Neubauer y azul de tripán para determinar su viabilidad. Para la purificación, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 40 mL de MACS Buffer + 7.5 mL de cocktail de anticuerpos biotinilados del kit de purificación por selección negativa para linfocitos T CD8⁺ (MACS, Miltenyi Biotec) por cada 10x10⁶ células y fueron incubadas por 10 minutos a 4°C. Luego, se agregaron 30 mL de MACS Buffer + 15 mL de *microbeads* anti-Biotina (MACS, Miltenyi Biotec) por cada 10x10⁶ células y se incubaron por 15 minutos a 4°C. Pasado el tiempo de incubación, las células fueron lavadas con FACS Buffer, centrifugadas en las condiciones anteriormente descritas y resuspendidas en 1 mL de FACS Buffer. Las células fueron seleccionadas negativamente utilizando una columna LS (MACS, Miltenyi Biotec) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3. Co-cultivos de linfocitos T CD8⁺ pMEL-1 y moDCs.

3.1 Titulación del péptido hgp100 y determinación de las condiciones de activación de LT CD8⁺ pMEL-1.

moDCs generadas *in vitro* fueron recolectadas, lavadas, resuspendidas en medio R10 y contadas. Luego, las células fueron pulsadas con el péptido hgp100 a concentraciones crecientes (0,01; 0,1; 0,5 y 1 mM) o con el péptido SIINFEKL (100 pM) por 20 minutos a 37°C, 5%CO₂. Luego las células fueron lavadas, resuspendidas en R10, contadas y llevadas a una concentración de 1x10⁶ células/mL. Paralelamente, LT CD8⁺ pMEL-1 y LT CD8⁺ WT fueron obtenidos como se indica en el punto 2.4 y resuspendidos a una concentración de 1x10⁶ células/mL. Luego, tanto las moDCs

como los linfocitos fueron plaqueados a 1×10^5 células/pocillo en R10 o R10 suplementado con 30 UI/mL de IL-2 recombinante humana, la cual es capaz de estimular LT murinos ya que el altamente conservada evolutivamente. Los co-cultivos se mantuvieron de 1 a 3 días a 37°C y $5\% \text{CO}_2$ para luego analizar por citometría de flujo la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25.

3.2 Cinética de activación de LT CD8⁺ pMEL-1

Para la realización de una cinética de activación de LT CD8⁺ pMEL-1, moDCs y linfocitos T CD8⁺ fueron obtenidos como se indica en 3.1. Para estos ensayos, las moDCs fueron pulsadas con una concentración 0,5 mM de péptido hgp100. Luego, se analizó mediante citometría de flujo la expresión del marcador de activación CD69 a distintos tiempos (30 min, 1, 3, 6 y 16 horas).

3.3 Ensayos de activación de LT CD8⁺ pMEL-1 en presencia de inhibidores de GJs.

Para la realización de estos ensayos, moDCs y linfocitos T CD8⁺ fueron obtenidos como se indica en 3.1. En estos ensayos las moDCs fueron pulsadas con una concentración de 0,5 mM del péptido hgp100. Para los tratamientos con inhibidores, todos los péptidos, ya sea inhibidores de Cx43 o control fueron utilizados a una concentración final de 300 mM, mientras que el inhibidor químico de GJs carbenoxolona se utilizó a una concentración final de 50 mM. Tanto los LT CD8⁺ como las moDCs fueron incubadas por separado con los distintos tratamientos por 15 minutos a 37°C y $5\% \text{CO}_2$, para luego plaquear 1×10^6 células/pocillo de cada tipo celular en las distintas condiciones. Los co-cultivos se mantuvieron por 3 horas a 37°C y $5\% \text{CO}_2$ para luego analizar por citometría de flujo la expresión de CD69.

4. Ensayos de transferencia de calceína entre moDCs y linfocitos T CD8⁺ pMEL-1.

Las células receptoras de calceína (LT CD8⁺) fueron teñidas con Cell Tracker Violet (Life Technologies) a una concentración final de 2,5 mM, siguiendo las instrucciones del fabricante, para luego ser resuspendidas a una concentración de 1×10^6 células/mL. Las células donadoras de calceína (moDCs) fueron incubadas con el cell tracker calceína-AM (Invitrogen) a una concentración final de 0,7 mM por 30 minutos a 4°C para luego ser lavadas con medio RPMI suplementado. Luego, fueron pulsadas con el péptido hgp100 o con el péptido SIINFEKL (100 pM) por 20 minutos a 37°C y 5%CO₂, para luego ser lavadas, resuspendidas en R10, contadas y llevadas a una concentración de 1×10^6 células/mL. Posteriormente, se realizaron co-cultivos a una razón de 1:1/DC:LT, por distintos tiempos de incubación dependiendo del ensayo. En el caso de las condiciones en que se utilizaron inhibidores de GJ, las células fueron incubadas separadamente por 15 minutos en presencia de dichos inhibidores, para luego ser co-cultivadas. Pasado el tiempo de incubación del co-cultivo, las células fueron recolectadas y fijadas con PFA 1X, para luego ser adquiridas en un citómetro FACSVerse (BD).

5. Citometría de Flujo

5.1 Tinción Superficial

Para la caracterización del fenotipo de las distintas células murinas, éstas fueron lavadas con FACS Buffer y luego incubadas por 20 min a 4°C en oscuridad con los anticuerpos correspondientes según cada experimento, los cuales se muestran en la Tabla I. Para la determinación de viabilidad, las células fueron teñidas ya sea con LIVE/DEAD® Fixable Aqua dilución 1:800 en PBS 1X (Molecular Probes, Thermofisher Scientific) por 10 min a temperatura ambiente o con 7-Aminoactinomicina D (7-AAD)

dilución 1:1000 por 8 minutos a 4°C. Las células fueron adquiridas en un citómetro FACSVerse (BD).

Tabla I. Anticuerpos utilizados para determinación por citometría de flujo de moléculas de superficie celular.

Anticuerpo	Fluoróforo	Clon	Dilución	Marca
CD11c	APC	N418	1/800	eBiosciences
MHC-II (IA[b])	FITC	25-09-01	1/100	BD Pharmingen™
MHC-II (IA/IE)	FITC	M5/114.15.2	1/800	Biolegend
MCH-I (H-2Kb)	APC	AF6-88.5	1/800	Biolegend
CD80	PE	16-10A1	1/800	Biolegend
CD86	PECy7	GL-1	1/800	Biolegend
CD8	VB510	53-6.7	1/500	Biolegend
CD25	APC	PC61	1/1500	Biolegend
CD69	APC	H1.2F3	1/400	Biolegend
Vβ13	V450	MR 12.3	1/400	BD Horizon™

5.2 Medición de la expresión de Cx43 en células obtenidas de ratones pMEL-1 y WT mediante citometría de flujo.

Para la determinación de la expresión de Cx43 en linfocitos T CD8⁺ y moDCs, esplenocitos y cultivos de 8-9 días de moDC, respectivamente, obtenidos de ratones pMEL o WT, fueron teñidos extracelularmente para distinguir las poblaciones celulares utilizando los anticuerpos correspondientes (Tabla I). Luego, las células fueron lavadas una vez con FACS Buffer, para después ser fijadas y permeabilizadas con *Fix/Perm Buffer* (Biolegend) por 30 minutos a 4°C en oscuridad. Pasado este tiempo de incubación, las células fueron lavadas una vez con Buffer de lavado *Permeabilization*

Buffer 1X (eBiosciences) e incubadas con anticuerpos *rabbit* anti-Cx43 (Sigma-Aldrich) en dilución 1:100 en buffer de lavado por 30 minutos a 4°C en oscuridad. Luego, las células fueron lavadas una vez con buffer de lavado e incubadas con un anticuerpo secundario *donkey anti-rabbit* Alexa-Fluor 488 (Invitrogen) en dilución 1:800 en buffer de lavado por 40 min a 4°C en oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas una vez en buffer de lavado para luego ser resuspendidas en FACS Buffer y adquiridas en un citómetro FACSVersé (BD).

6. Softwares y análisis estadístico

Para el análisis de datos de citometría de flujo se utilizó el software FlowJo 8.7 (LLC). Para la construcción de gráficos y análisis estadístico se utilizó el software Prism 6 (GraphPad). Para la determinación de significancia se utilizó el test t de *Student*, donde resultados con un p menor o igual a 0,05 fueron considerados significativos. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

RESULTADOS

Medición de la expresión de Cx43 y caracterización del modelo moDC/pMEL-1

En estudios anteriores de nuestro laboratorio, se ha trabajado con modelos celulares humanos que han permitido estudiar el rol de las GJ en la respuesta antitumoral. Sin embargo, la obtención de linfocitos T vírgenes específicos para un antígeno asociado a melanoma a partir de sangre periférica de donantes sanos es difícil y poco factible, por lo que decidimos utilizar el modelo murino transgénico pMEL-1. Los linfocitos T CD8⁺ de este ratón, en conjunto con células presentadoras de antígenos profesionales, es un modelo celular antígeno-específico asociado a melanoma que nos permite estudiar el papel de estos canales en el proceso de activación de linfocitos T CD8⁺. Como modelo de célula presentadora de antígenos utilizamos células dendríticas derivadas de médula ósea (moDC) usando como agente diferenciador la citoquina recombinante GM-CSF, la cual permite la obtención de células equivalentes a células dendríticas generadas en un contexto inflamatorio. Estas células se caracterizan por la expresión de altos niveles de CD11c y MHC-II (Lutz y cols., 1999; Mildner y Jung, 2014; Helft y cols., 2015) y son altamente utilizadas como presentadoras de antígenos. En este trabajo observamos que nuestras DCs expresan altos niveles de MHC-I y moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86, cuyos niveles aumentan al activar las células O.N. con 100 ng/mL de LPS (Figura 4), el cual es comúnmente utilizado para inducir “maduración” de DCs (Helft y cols., 2015).

En estudios anteriores se ha reportado que Cx43 es expresada en linfocitos. Es más, se ha encontrado un aumento en la expresión de Cx43 en linfocitos activados, donde su bloqueo reduce su proliferación, sugiriendo un rol de Cx43 en el mantenimiento de la expansión clonal de LTs (Oviedo-Orta y cols, 2010; Ni y cols,

2017). Sin embargo, esto nunca ha sido determinado en LT provenientes de ratones pMEL-1. Es por esto que se compararon los niveles de expresión de Cx43 entre LT provenientes de ratones pMEL-1 y el control de *background* genético C57BL/6 (WT) por medio de citometría de flujo. Se observa que no existen diferencias significativas en la expresión de Cx43 en LT CD8⁺ en el modelo murino pMEL-1 respecto de su contraparte WT, así como tampoco entre moDCs y DCs de bazo de ratones WT (Figura 5). Ya que LT de ratones transgénicos pMEL no tienen alteraciones en la expresión de Cx43 respecto a sus contrapartes WT, podemos deducir que los efectos o resultados obtenidos en los experimentos posteriores son representativos de un contexto o célula “normal” y no se deben a que existe una alteración del fenómeno por un desequilibrio de la contribución de GJ-Cx43 en éste último, por lo que podemos utilizar el modelo transgénico pMEL-1 para estudios de estos canales.

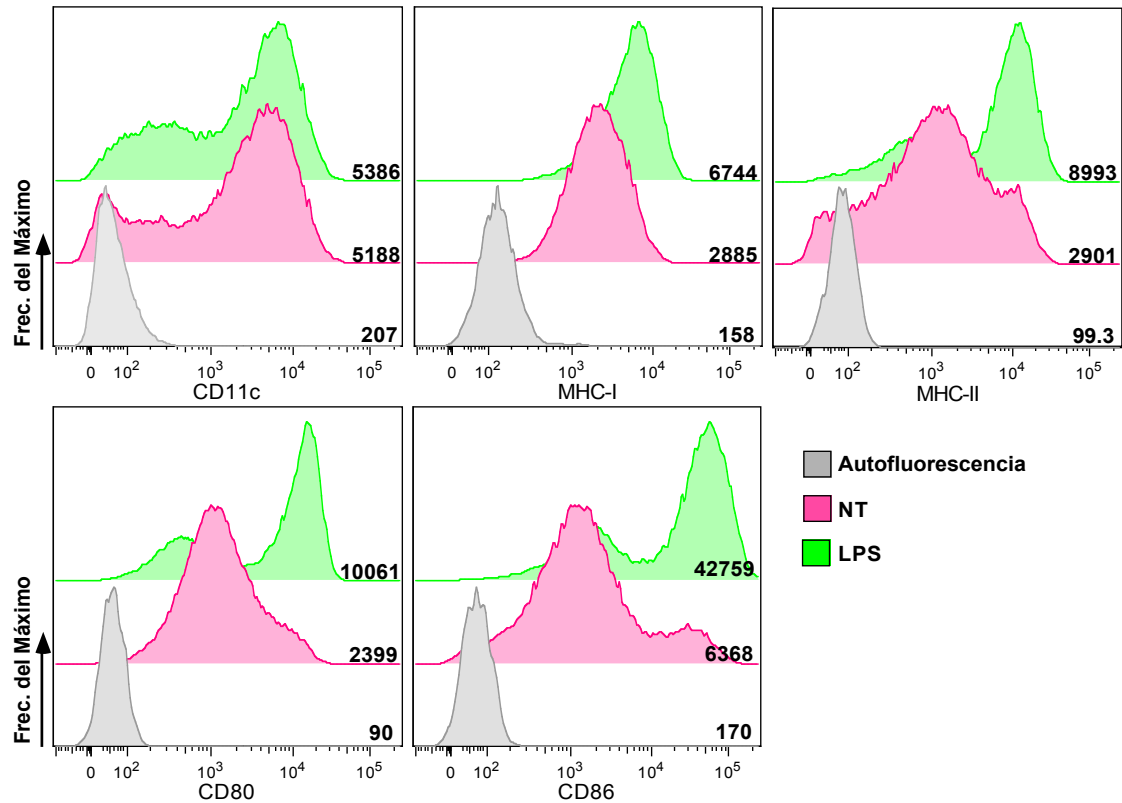


Figura 4. Caracterización de células dendríticas generadas a partir de precursores de médula ósea. Utilizando precursores de médula ósea y en presencia de la citoquina GM-CSF se generaron células dendríticas *in vitro*, las cuales denominamos moDC. Al término del cultivo (día 8-9) las células fueron analizadas por citometría de flujo para su caracterización. Para la activación de las células, éstas fueron cultivadas O.N. con 100 ng/mL de LPS. Se muestran histogramas representativos de 5 experimentos independientes con su respectivo IMF (*Intensidad Media de Fluorescencia*) para cada marcador, donde MHC-I, MHC-II, CD80 y CD86 fueron analizados dentro de la población CD11c⁺.

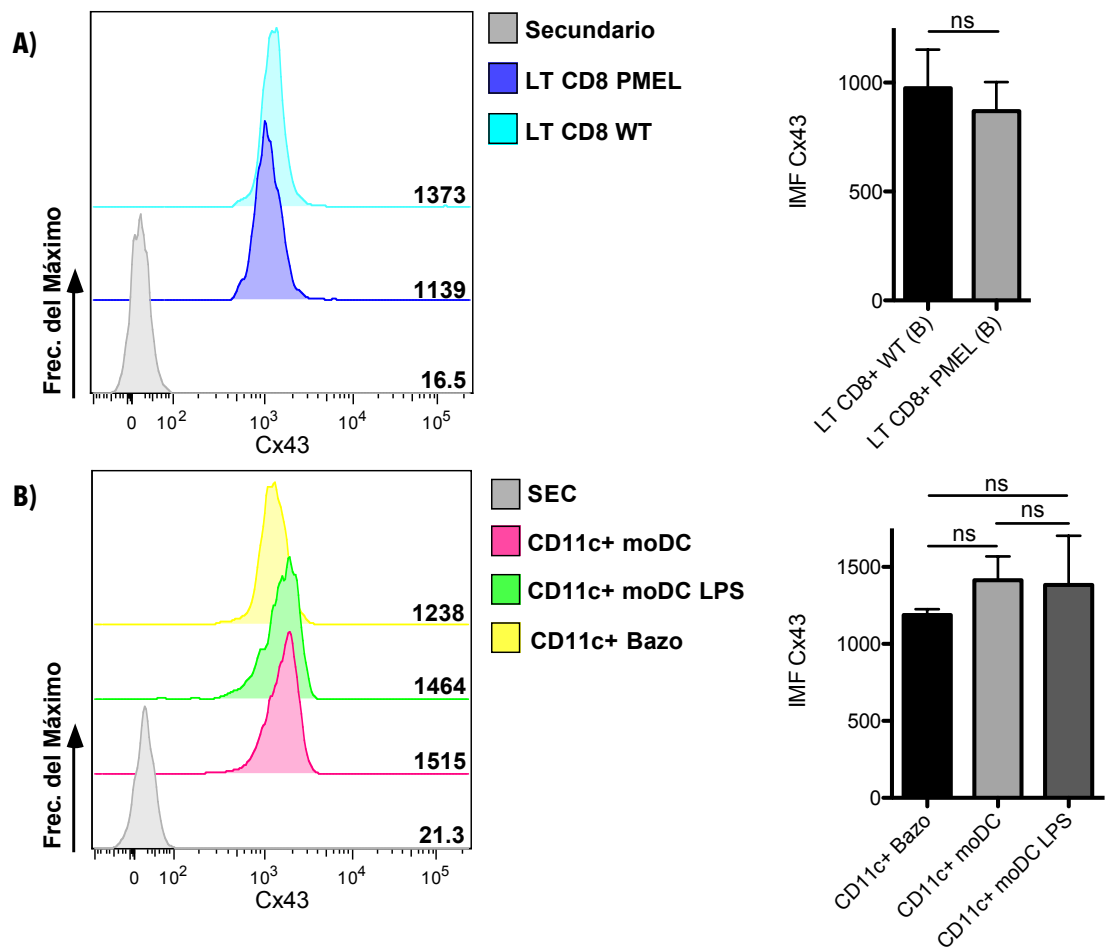


Figura 5. Expresión de Cx43 en linfocitos T CD8⁺ en modelo transgénico pMEL-1 y células dendríticas generadas a partir de precursores de médula ósea. A) Expresión de Cx43 medido por medio de citometría de flujo en linfocitos T CD8⁺ en bazo de ratones pMEL-1 y ratones WT. Se muestran histogramas representativos de 5 experimentos independientes (izquierda) y gráfico de barras de la IMF de Cx43 (derecha). **B)** Expresión de Cx43 medido por medio de citometría de flujo en células dendríticas de bazo de ratones WT, células dendríticas generadas a partir precursores de médula ósea no activadas (moDC) o activadas con 100 ng/mL de LPS (moDC LPS). Se muestran histogramas representativos de 4 experimentos independientes (izquierda) y gráfico de barras de la IMF de Cx43 (derecha). ns: no significativo. SEC: Anticuerpo secundario solo.

Titulación del péptido hgp100₂₅₋₃₃ y determinación de condiciones de activación mediada por moDCs de linfocitos T CD8⁺ pMEL-1.

En primera instancia, se realizó la titulación de la concentración de péptido hgp100₂₅₋₃₃ a utilizar en ensayos de activación de linfocitos T CD8⁺ pMEL-1. Para ello, linfocitos T CD8⁺ pMEL-1 fueron co-cultivados con moDCs pulsadas con concentraciones crecientes del péptido. El pulso permite que éste se una a las moléculas de MHC-I presentes en la membrana plasmática sin tener que ser procesado por las DCs y de esa manera pueden ser presentados a los LT (Figura 6A). Estos co-cultivos se realizaron en presencia o ausencia de 30 μ M de rhIL-2, para determinar si es necesaria su adición al cultivo para que estos linfocitos puedan activarse. Para evaluar si los linfocitos se activaron, se analizó la expresión de los marcadores de activación CD69 (día 1 post co-cultivo) y CD25 (días 1 y 3 post co-cultivo). Para ello, primero se seleccionó la población linfoide de acuerdo a tamaño y granulosidad, para luego seleccionar la población CD8⁺. Dentro de ésta, se analizó el porcentaje de células positivas para los marcadores de activación anteriormente mencionados (Figura 6B). Como control negativo se utilizaron linfocitos T CD8⁺ pMEL-1 sin co-cultivar con moDC, los cuales no se activan ya que no existe el antígeno hgp100 presente para ser reconocido por sus TCRs. Como control positivo se utilizaron linfocitos T CD8⁺ pMEL-1 en presencia del antígeno hgp100 de manera soluble, el cual se unirá a las moléculas de MHC-I de los mismos linfocitos y será presentado a otros linfocitos del mismo cultivo. Además, se utilizaron dos controles de especificidad: en el primero utilizamos DCs pulsadas con el péptido de la proteína OVA, SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), el cual es un péptido irrelevante para el modelo, pero que es capaz de ser presentado en un contexto de MHC-I, co-cultivadas con linfocitos T CD8⁺ pMEL-1; en el segundo utilizamos DCs pulsadas con el péptido hgp100 co-cultivadas con linfocitos

T CD8⁺ obtenidos de ratones WT. En el primer caso, la activación no debería ocurrir ya que el péptido presentado no es capaz de activar los linfocitos T pMEL-1, ya que éstos sólo se activan al reconocer el antígeno hgp100 en un contexto de MHC-I y no otro péptido. En el segundo caso, la activación no debería ocurrir ya que los linfocitos T CD8⁺ obtenidos de ratones WT no serán específicos para el antígeno hgp100, si no que encontramos una población heterogénea con múltiples TCRs específicos para distintos antígenos donde sólo una pequeña población no representativa podría potencialmente reconocer el antígeno presentado por las mDCs.

Nuestros resultados muestran que este modelo es muy sensible, activándose sobre un 90% de los linfocitos incluso utilizando concentraciones de 0,01 μ M al día 1 post co-cultivo. Sin embargo, dicha concentración no fue suficiente para activar por completo los linfocitos al día 3 post co-cultivo. Se observó que 0,5 μ M fue una concentración de péptido suficiente para activar a los linfocitos luego de 1 o 3 días de co-cultivo, incluso de mejor manera que la concentración 1 μ M, la cual es una concentración altamente utilizada en la literatura (Figura 6C) (Overwijk y cols., 2003). Por lo tanto, decidimos utilizar 0,5 μ M del péptido hgp100₂₅₋₃₃ en los ensayos posteriores ya que es una concentración suficiente para la activación de los linfocitos T CD8⁺ pMEL-1, pero no saturante del sistema, lo que nos permitirá observar de mejor manera los efectos que las GJs pudiesen tener en la activación de LT CD8⁺ mediada por DCs. Además, no observamos diferencias en la activación de los linfocitos entre los co-cultivos con y sin rhIL-2, lo que nos indica que los linfocitos T CD8⁺ pMEL-1 producen suficiente IL-2 para poder activarse, por lo que determinamos que no es necesario agregarla al co-cultivo al momento del ensayo. Se observó que en el control negativo no hay activación de los linfocitos y que en los controles de especificidad hay

un porcentaje menor de activación, lo que nos indica que la activación es antígeno específica.

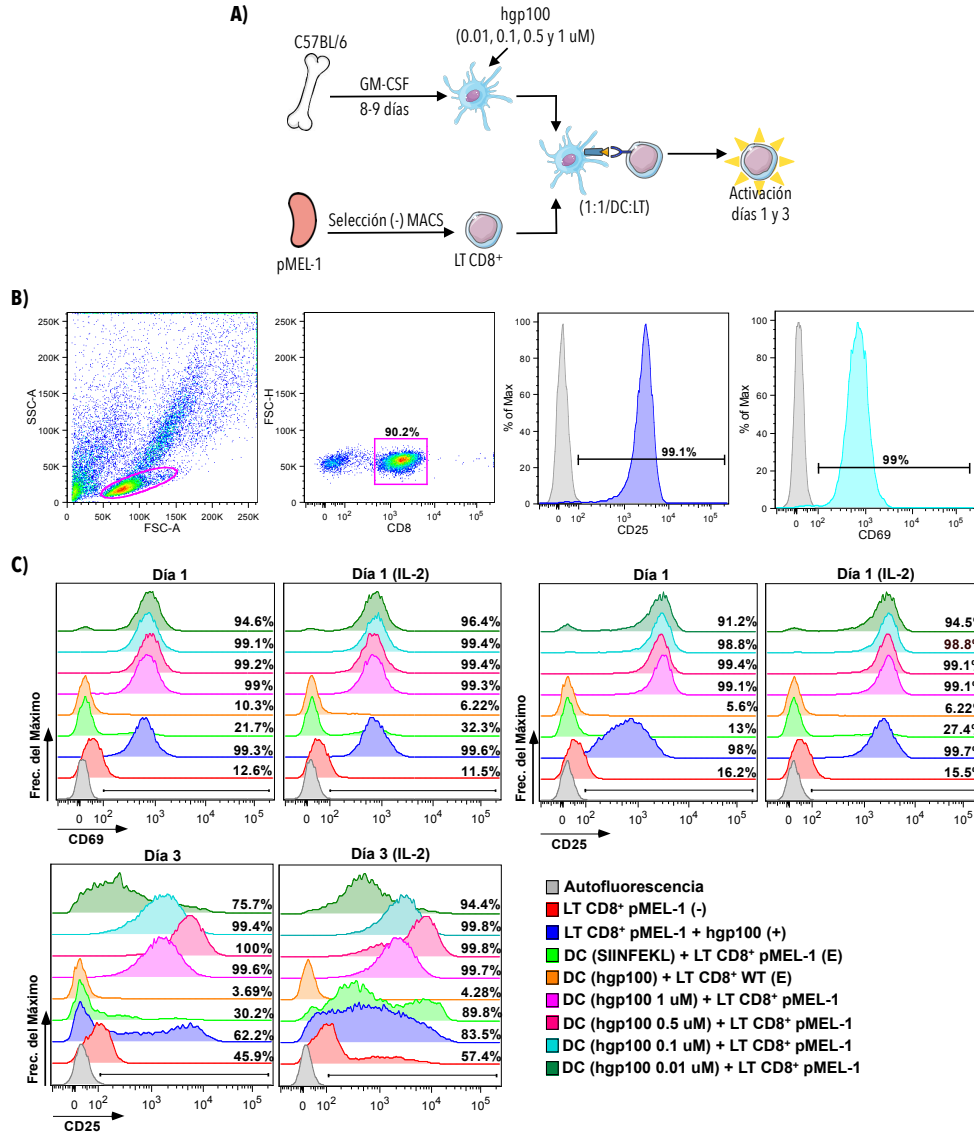


Figura 6. Titulación del péptido hgp100 y condiciones de activación de linfocitos T CD8⁺ pMEL-1. **A)** Representación gráfica del protocolo utilizado para la titulación del péptido hgp100₂₃₋₅₅. 1x10⁵ linfocitos T CD8⁺ obtenidos por selección negativa a partir de esplenocitos de un ratón pMEL-1 fueron co-cultivados con 1x10⁵ moDC pulsadas con concentraciones crecientes del péptido hgp100₂₅₋₃₃ para luego evaluar los marcadores de activación CD69 y CD25 a los días 1 y 3 post co-cultivo, respectivamente. **B)** Estrategia de análisis para la activación de linfocitos T CD8⁺ pMEL-1. **C)** Histogramas representativos que muestran la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25 en linfocitos T CD8⁺ pMEL-1 luego de 1 o 3 días de co-cultivo con células dendríticas derivadas de precursores de médula ósea, pulsadas con concentraciones crecientes de péptido hgp100₂₅₋₃₃, en presencia o ausencia de rhIL-2. (-): control negativo; (+): control positivo; (E): Control de especificidad.

Cinética de activación de linfocitos T CD8⁺ pMEL-1 mediada por moDCs.

La formación de GJs entre DCs y LT es un fenómeno que ocurre tempranamente en el proceso de activación de LTs, en conjunto con la formación de la sinapsis inmunológica (Mendoza-Naranjo, 2011). Es por esto que decidimos hacer una cinética de activación temprana de los LT, para determinar el tiempo óptimo de evaluación del papel de las GJs en la activación mediada por moDCs de LT CD8⁺ pMEL-1.

Se realizaron co-cultivos de moDC pulsadas con 0,5 μ M de péptido hgp100₂₅₋₃₃ con linfocitos T CD8⁺ pMEL-1, donde se evaluó la expresión del marcador de activación temprano CD69 en los LTs a distintos tiempos post co-cultivo. Se observó activación de los LT luego de una hora de co-cultivo, llegando a un máximo de activación a las 3 horas post co-cultivo (Figura 7). En base a estos resultados, en los siguientes experimentos decidimos evaluar el papel de las GJs en la activación de estos LT luego de 3 horas de co-cultivo con moDCs. Ya que la vida media de Cx43 en canales GJs es de aproximadamente 4 horas (Falk y cols., 2009), el tiempo de evaluación escogido, se encontraría dentro de la ventana de inhibición por parte de los péptidos miméticos de Cx43, permitiéndonos potencialmente observar el efecto de dicha inhibición el proceso de activación de los LTs.

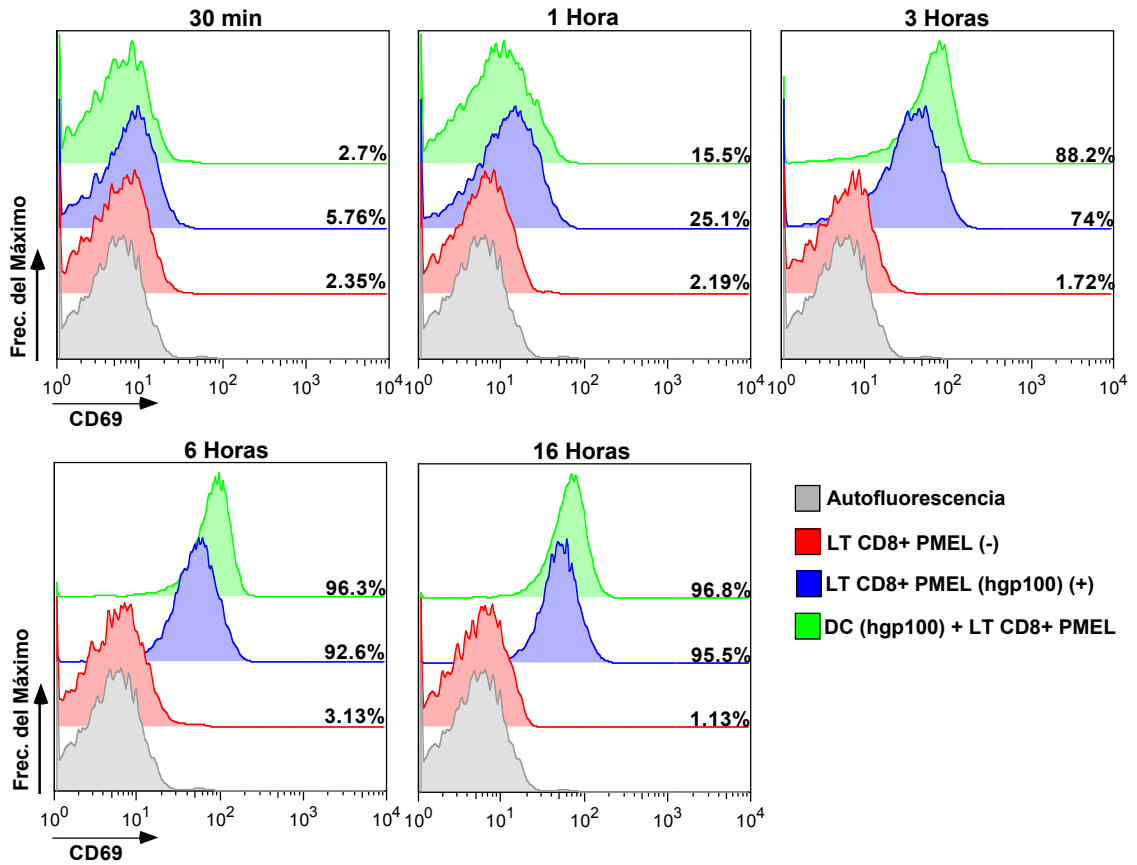


Figura 7. Cinética de activación mediada por moDCs de linfocitos T CD8⁺ pMEL-1. Histogramas muestran la expresión del marcador de activación temprano CD69 en linfocitos T CD8⁺ pMEL-1 por medio de citometría de flujo, luego de tiempos crecientes de co-cultivo con células dendríticas derivadas de precursores de médula ósea, pulsadas con 0,5 μ M de péptido hgp100. (-): control negativo; (+): control positivo.

moDC transfieren calceína a linfocitos T CD8⁺ pMEL-1 de manera antígeno específica.

Para determinar la formación acoplamiento celular mediado por GJs funcionales entre moDC y linfocitos T CD8⁺ pMEL-1, realizamos ensayos de transferencia de calceína desde moDC hacia LT CD8⁺ pMEL-1, la cual fue determinada por medio de citometría de flujo. El derivado acetometoxi (AM) no fluorescente de la calceína (calceína-AM) puede ser importado a través de la membrana plasmática de células vivas. Una vez dentro de la célula, esterasas intracelulares remueven el grupo acetometoxi, la molécula de calceína luego queda atrapada dentro de la célula y emite fluorescencia verde. Como las células muertas no tienen esterasas activas, sólo las células vivas conteniendo calceína serán fluorescentes. Dado que la calceína es un fluoróforo permeable por GJs, al formarse GJs funcionales entre dos células, ésta puede ser transportada de una célula a otra (Fonseca y cols., 2006; Abbaci y cols., 2008). En estos ensayos, moDC fueron cargadas con calceína para luego ser pulsadas con 0,5 µM de péptido hgp100₂₅₋₃₃. LT CD8⁺ pMEL-1 obtenidos por medio de selección negativa mediante MACS fueron marcados con 2,5 µM CellTracker™ Violet BMQC (no difusible por canales GJs) para poder distinguir la población aceptora de calceína. Las células fueron co-cultivadas por distintos tiempos (Figura 8A). Para determinar el porcentaje de LT CD8⁺ pMEL-1 que adquirieron calceína desde moDCs, se seleccionó primero la población linfoide, se eliminaron los dobletes y se analizó la población calceína positiva dentro de la población Violet BMQC positiva (Figura 8C).

En primera instancia, realizamos un ensayo de cinética de transferencia de calceína desde moDC hacia linfocitos T CD8⁺ pMEL-1, con el fin de determinar el tiempo ideal para ensayos posteriores. Nuestros resultados indicaron que luego de una hora de co-

cultivo ya se observó un máximo de transferencia de calceína desde moDCs hacia LT (Figura 9A). Luego, se realizaron experimentos de transferencia de calceína entre moDCs y LT CD8⁺ pMEL-1 (co-cultivados por una hora) incluyendo los mismos controles de especificidad utilizados en los experimentos de activación (Figura 6), es decir, moDC pulsadas con un péptido irrelevante y LT CD8⁺ no específicos para el péptido hgp100₂₅₋₃₃. Como se observa en la Figura 9B, existe transferencia de calceína entre moDCs y LT CD8⁺ pMEL-1, la cual es significativamente mayor en la condición antígeno específica respecto de los controles de especificidad, por lo que podemos decir que dicha transferencia es antígeno específica.

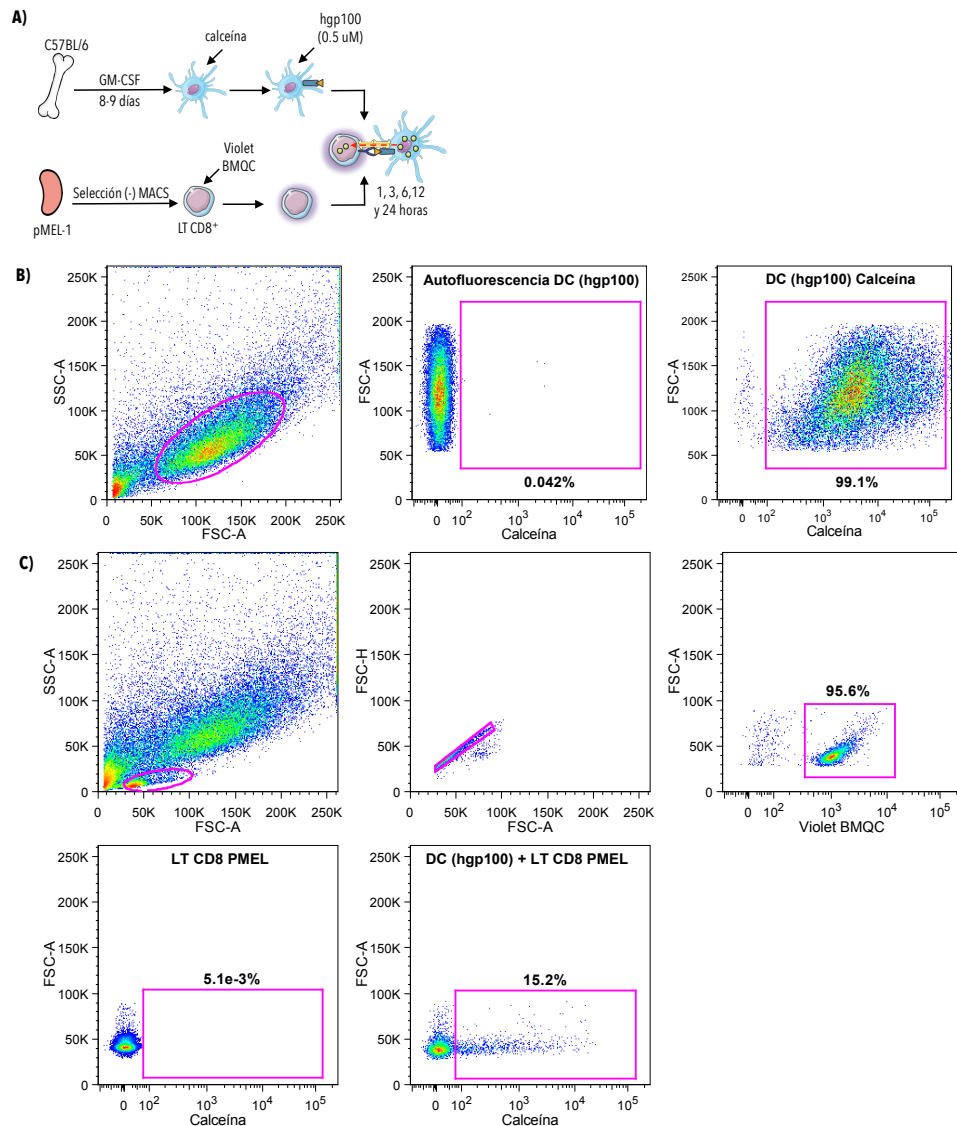


Figura 8. Estrategia de análisis para ensayos de transferencia de calceína entre moDC y LT CD8⁺ pMEL-1 **A)** Representación gráfica del protocolo utilizado para ensayos de transferencia de Calceína entre moDCs y LT CD8⁺ pMEL-1. 1×10^5 linfocitos T CD8⁺ obtenidos por selección negativa a partir de esplenocitos de un ratón pMEL-1 fueron marcados con Violet BMQC y co-cultivados por diferentes tiempos (como se indica) con 1×10^5 moDCs pulsadas con $0,5 \mu\text{M}$ del péptido hgp100₂₅₋₃₃. **B)** Dot plots representativos para cultivos puros de células dendríticas. Se muestran las células sin marcar (centro) y marcadas con calceína (derecha). **C)** Estrategia de análisis para la transferencia de calceína desde moDCs hacia LT CD8⁺ pMEL-1. Se seleccionó la población linfoide y se descartaron dobletes dentro de la misma. Luego, se seleccionó la población Violet BMQC⁺ para luego analizar el porcentaje de células positivas para calceína. La gate para las células positivas para calceína se generó a partir de LT CD8⁺ pMEL-1 sin co-cultivar con células dendríticas.

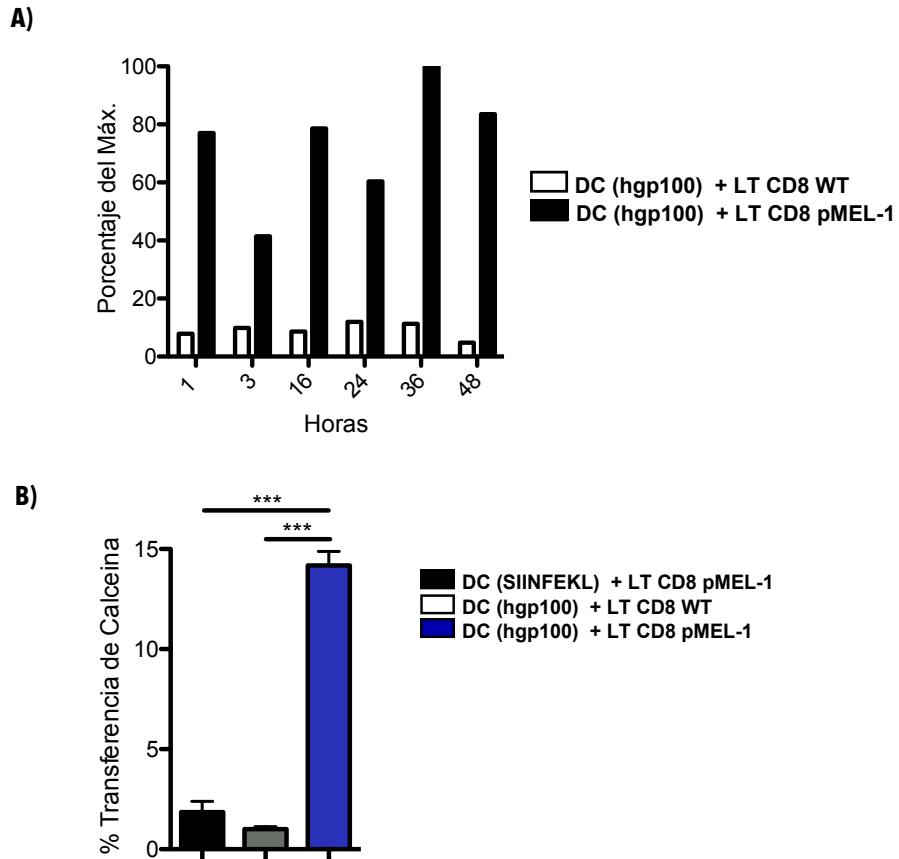


Figura 9. Existe transferencia de calceína entre moDCs y LT CD8⁺ pMEL-1 en un contexto antígeno específico. A) Gráfico de barras de la cinética de transferencia de calceína entre moDC y LT CD8⁺ pMEL-1. Se muestra la transferencia de calceína a las 1, 3, 16, 24 y 48 horas post-cocultivo, como porcentaje del máximo de transferencia. **D)** Gráfico de barras de ensayos de transferencia de calceína de 1 hora entre moDCs y LT CD8⁺ pMEL-1, utilizando controles de especificidad. Se muestra la media \pm S.E.M. de los resultados de 3 experimentos independientes, cada experimento se realizó de triplicado a quintuplicado. *** $p < 0.001$; ns: no significativo.

El péptido inhibidor mimético de Cx43, Gap 27, no inhibe el acoplamiento celular entre moDCs y LT CD8⁺ pMEL-1 ni la activación de LT CD8⁺ pMEL-1.

Para determinar si las GJ-Cx43 tienen un papel en la activación de LT CD8⁺ pMEL-1, realizamos tanto ensayos de transferencia de calceína entre moDCs y LT CD8⁺ pMEL-1 como ensayos de activación mediada por moDCs de LT CD8⁺ pMEL-1 en presencia de un péptido inhibidor mimético de Cx43 llamado Gap 27. Los péptidos miméticos de conexinas son péptidos sintéticos cortos que corresponden a secuencias de los loops extracelulares de las conexinas (Evans y Boitano, 2001), los cuales se unen a hemicanales de conexinas, influyendo en sus propiedades de canal, conductividad eléctrica, liberación de ATP, entre otros, bloqueando el paso de fluoróforos y otras moléculas (Evans y Leybaert, 2007). Específicamente, Gap 27 se une al loop extracelular 2 de Cx43. Estos péptidos inhibidores son reversibles, lo que los hace candidatos ideales para ser utilizados como moduladores de la comunicación mediada por GJs (Evans y Boitano, 2001). Como péptido control, se utilizó un péptido sintético el cual posee los mismos aminoácidos que Gap 27, pero en una secuencia aleatoria, el cual llamamos Scramble de Gap 27 (ScrG27). Para la realización de estos ensayos de activación y transferencia de calceína, se utilizaron los mismos protocolos anteriormente mencionados, con la salvedad de que en aquellas condiciones donde se utilizó el péptido inhibidor Gap 27 o el péptido control ScrG27, las células fueron incubadas con los péptidos por 15 minutos a 37°C y luego fueron co-cultivadas en presencia de los péptidos por distintos tiempos. Los resultados obtenidos indican que no hubo inhibición de la transferencia de calceína al utilizar el péptido Gap27, ya que no existen diferencias significativas con respecto al nivel de transferencia observado al utilizar el péptido control ScrG27 o la condición sin tratamiento (Figura 10).

De la misma manera, la adición del péptido Gap 27 no generó disminución significativa en la activación mediada por moDCs de LT CD8⁺ pMEL-1, respecto de la condición control (Figura 11). Esto podría significar principalmente dos cosas: que Cx43 no tiene influencia en la activación de LT CD8⁺ en el modelo utilizado o que el péptido Gap 27 utilizado no esté inhibiendo las GJs formadas por Cx43. Sin embargo, estudios anteriores sugieren fuertemente que las GJ-Cx43 podrían estar involucradas en el proceso de activación de LT CD8⁺ (Elgueta y cols., 2009; Mendoza-Naranjo y cols., 2007; Lillo, 2015. No publicado). Por lo tanto decidimos probar la funcionalidad inhibitoria del péptido Gap 27 en modelos celulares con GJ-Cx43 funcionales demostrada. Para ello optamos por usar dos modelos: HEK-293, una línea celular derivada de células renales embrionarias, las cuales expresan Cx43 (Sroka, 2008) y el modelo moDC/LT CD4⁺ OT-II (Elgueta y cols., 2009; Mendoza-Naranjo y cols., 2007).

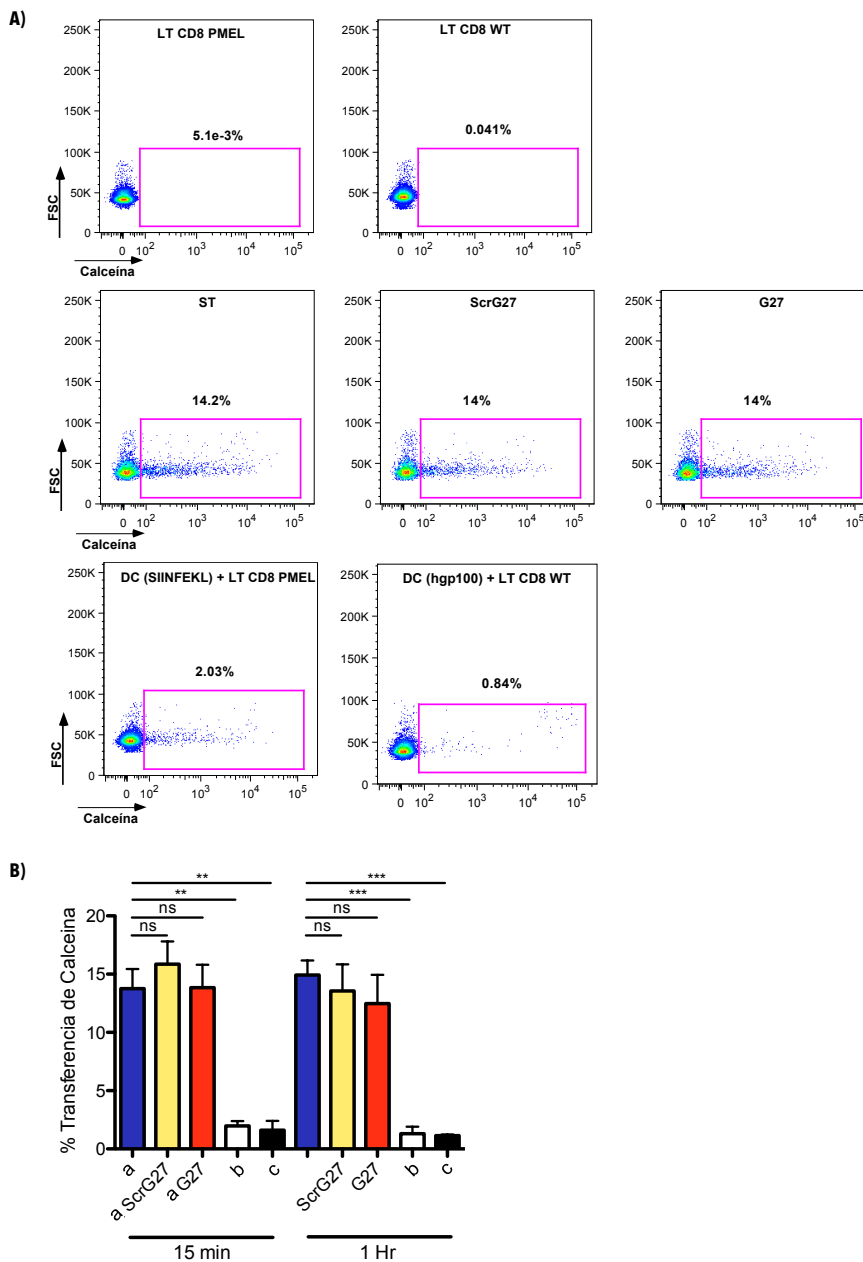


Figura 10. El péptido inhibidor mimético de Cx43 Gap 27 no inhibe la transferencia de calceína entre moDCs y LT CD8⁺ pMEL-1. **A)** Dot plots representativos de la transferencia de calceína entre moDC y LT CD8⁺ pMEL-1. Se muestran los controles de LT solos (arriba), co-cultivos de moDC (hgp100) con LT CD8⁺ pMEL-1 (al medio) y controles de especificidad (abajo). **B)** Gráfico de barras del porcentaje de transferencia de calceína en las distintas condiciones. a: moDC (hgp100) con LT CD8⁺ pMEL-1; b: moDC (SIINFEKL) + LT CD8⁺ pMEL-1; c: moDC (hgp100) con LT CD8⁺ WT. Se muestra la media \pm S.E.M. de los resultados de 3 experimentos independientes, cada experimento se realizó en triplicado. ScrG27: Scramble de Gap 27. G27: Gap 27. *** $p < 0.001$; ns: no significativo.

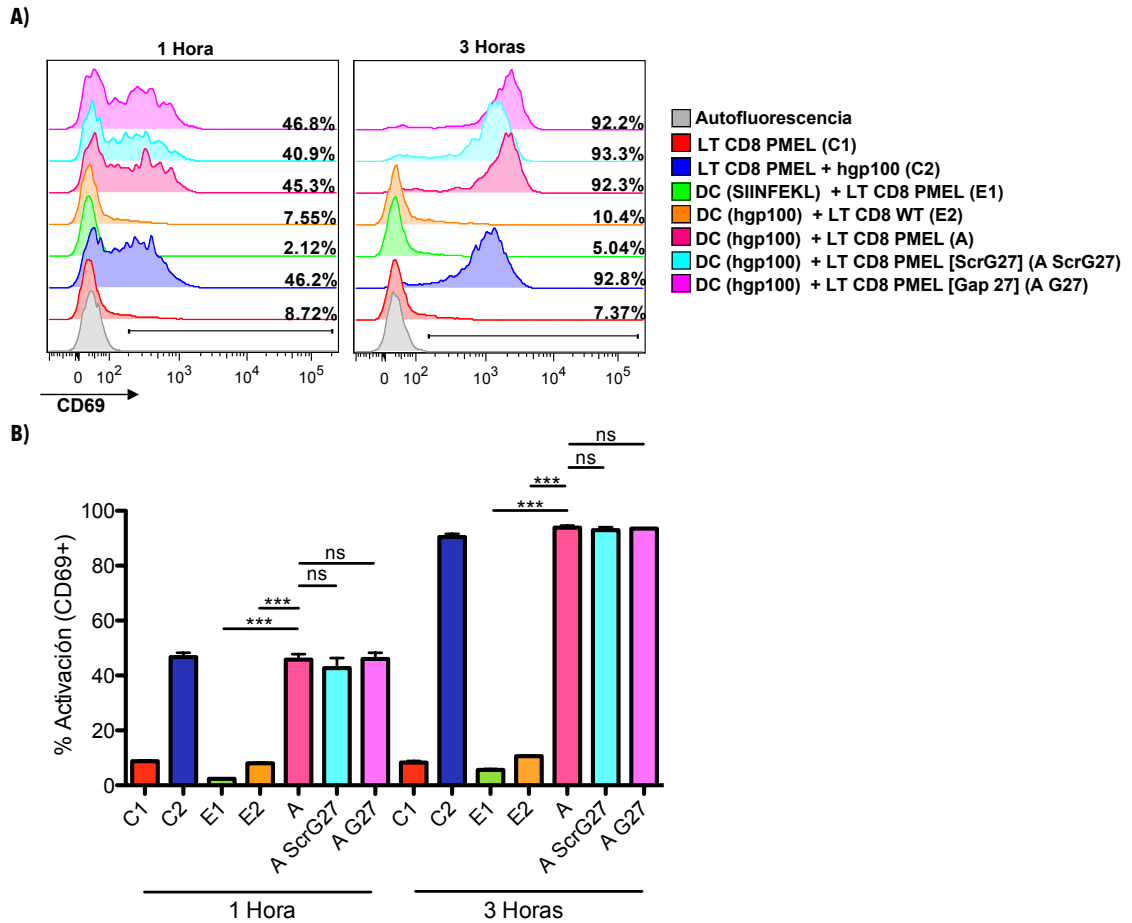


Figura 11. La inhibición de GJ-Cx43 utilizando el péptido inhibidor mimético de Cx43 Gap27 no tiene efecto en la activación mediada por moDCs de los LT CD8⁺ pMEL-1. A) Histogramas representativos que muestran la expresión del marcador de activación CD69 en linfocitos T CD8⁺ pMEL-1 luego de 1 o 3 horas de co-cultivo con células dendríticas derivadas de precursores de médula ósea pulsadas con péptido hgp100₂₅₋₃₃, en presencia o ausencia de péptido mimético de Cx43 Gap 27. **B)** Gráfico de Barras del porcentaje de células positivas para CD69 en las distintas condiciones. A: moDC (hgp100) con LT CD8⁺ pMEL-1; E1: moDC (SIINFEKL) + LT CD8⁺ pMEL-1; E2: moDC (hgp100) con LT CD8⁺ WT; C1: control negativo; C2: control positivo. Se muestra la media \pm S.E.M. de los resultados de 3 experimentos independientes, cada experimento se realizó en triplicado. ScrG27: Scramble de Gap 27. G27: Gap 27. *** $p < 0.001$; ns: no significativo.

Se realizaron ensayos de transferencia de calceína en los dos modelos celulares mencionados, utilizando los péptidos Gap 27 y ScrG27. Células HEK-293 cargadas con calceína (dadoras) o el CellTracker Violet BMQC (aceptoras) fueron co-cultivadas por 1, 2 y 4 horas. Los resultados mostraron que la transferencia de calceína entre células HEK-293 aumenta con el tiempo de co-cultivo. Sin embargo, solo observamos una pequeña y no significativa inhibición de la transferencia de calceína al utilizar el péptido Gap 27 luego de una hora de co-cultivo (Figura 12). Para el ensayo en el modelo moDC/LT CD4⁺ OT-II, se hicieron co-cultivos de 3 horas de moDCs pulsadas con el péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ y LT CD4⁺ OT-II (específicos para este péptido), purificados por selección negativa mediante MACS. Se observó transferencia de calceína entre estas células, sin embargo, no se observaron diferencias entre la condición con péptido inhibidor y el péptido control o condición sin tratamiento (Figura 13). En conjunto, estos resultados sugieren que el péptido mimético de Cx43 Gap 27 no se encuentra funcionando óptimamente, ya que no genera inhibición de la transferencia de la calceína en los modelos anteriormente probados.

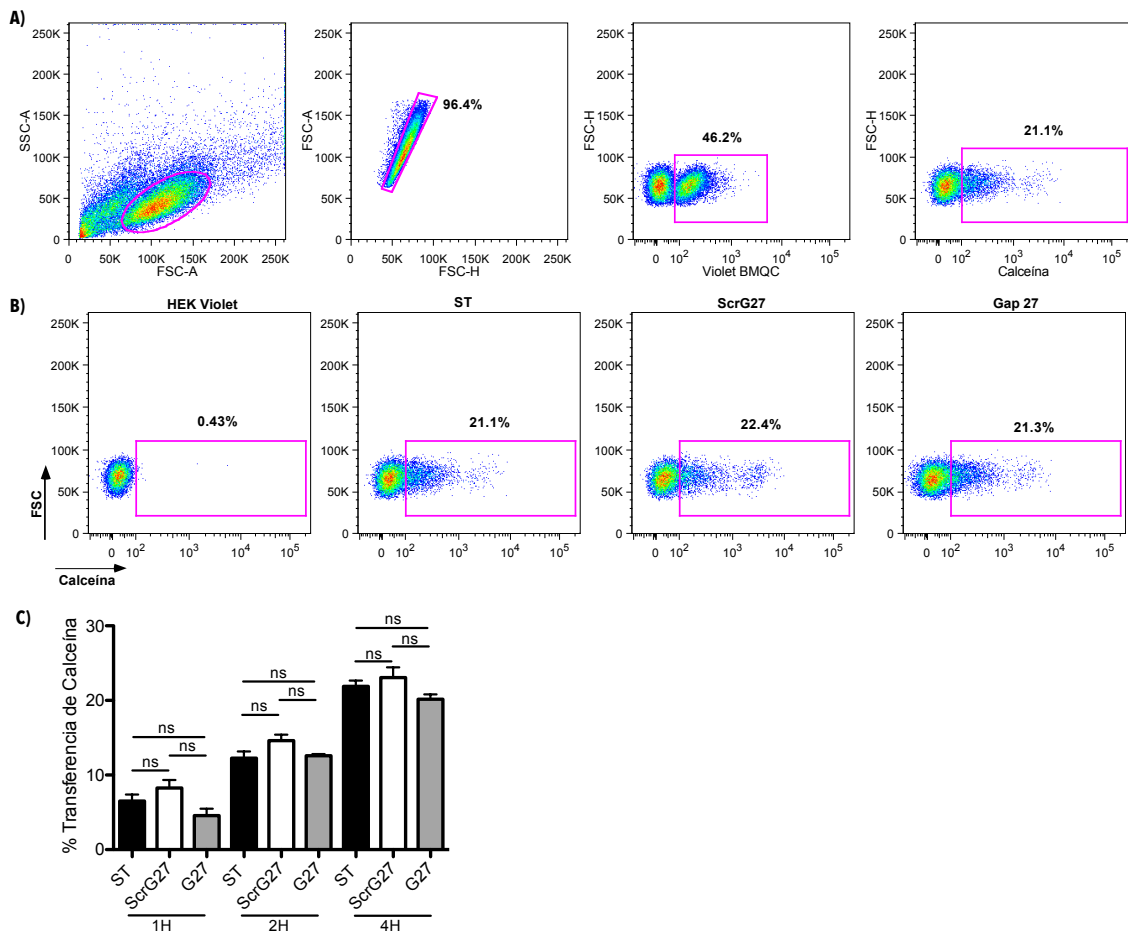


Figura 12. El péptido mimético de Cx43 Gap 27 no inhibe la transferencia de calceína entre células HEK-293. A) Estrategia de *gating* para el análisis de la transferencia de calceína entre células HEK-293. **B)** *Dot plots* representativas de la transferencia de calceína entre células HEK-293 para 4 horas. Se muestra el control sin co-cultivos con células cargadas con calceína, condición sin tratamiento (ST), péptido control Scramble de Gap 27 (ScrG27) y péptido mimético de Cx43 Gap 27. **C)** Gráfico de barras del porcentaje de transferencia de calceína entre células HEK-293 en las distintas condiciones, para 1, 2 y 4 horas de co-cultivo. ns: no significativo.

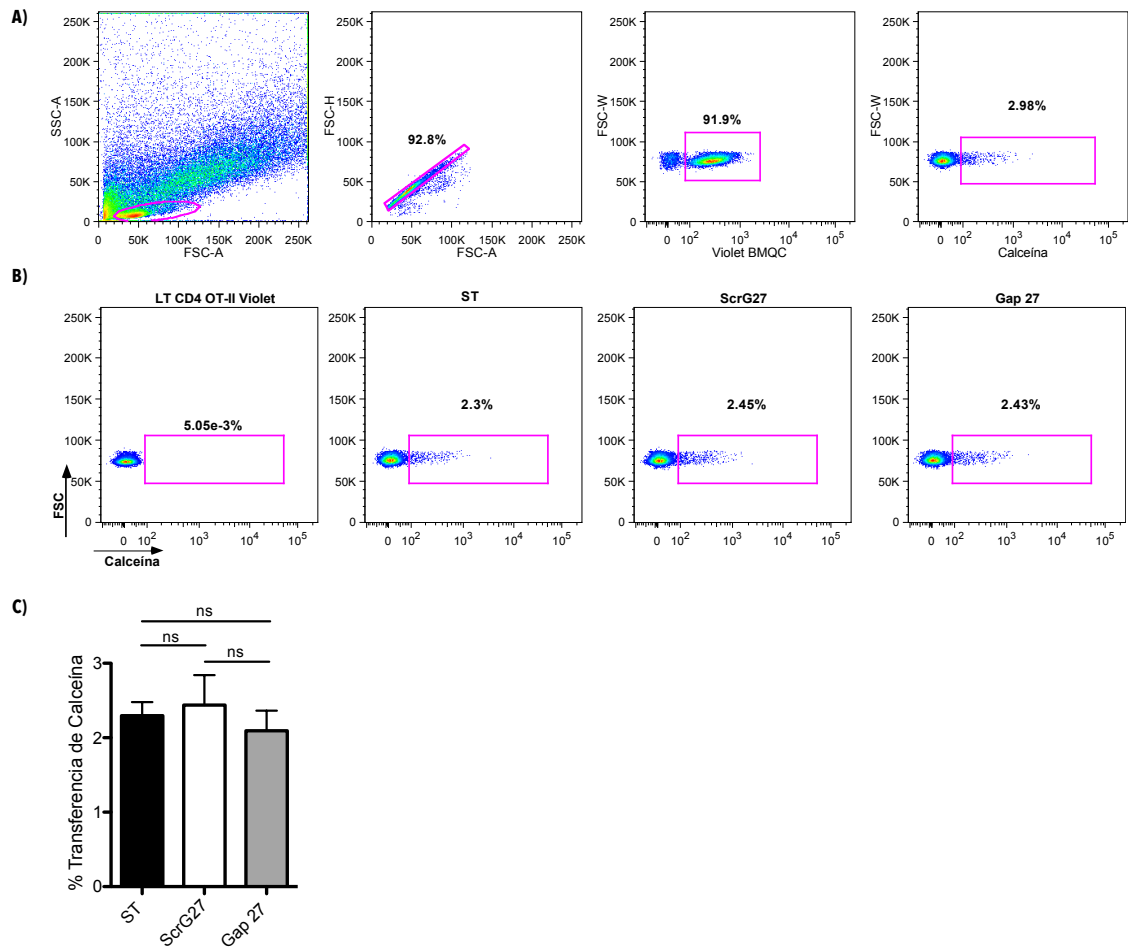


Figura 13. El péptido mimético de Cx43 Gap 27 no inhibe la transferencia de calceína entre moDC y LT CD4⁺ OT-II. **A)** Estrategia de gating para el análisis de transferencia de calceína entre moDC pulsadas con el péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ y LT CD4⁺ OT-II. **B)** Dot plots representativos de la transferencia de calceína entre moDC pulsadas con el péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ y LT CD4⁺ OT-II, en presencia o ausencia (ST) del péptido mimético de Cx43 Gap 27 o el péptido control Scramble de Gap 27 (ScrG27). **C)** Gráfico de barras de la transferencia de calceína entre moDC y LT CD4⁺ OT-II en las diferentes condiciones mencionadas anteriormente. ns: no significativo.

DISCUSIÓN

Dentro de la respuesta inmune adaptativa y antitumoral, existen diferentes procesos que son dependientes de contacto célula-célula necesarios para una respuesta inmune eficiente, las cuales van desde la presentación antigénica hasta el proceso de citotoxicidad contra células neoplásicas (Trautmann y Valitutti, 2003). Ambos procesos mencionados involucran a nivel molecular la formación de una estructura organizada conocida como sinapsis inmunológica, donde participan distintas moléculas importantes para que estos procesos ocurran de forma efectiva. En el caso del *priming* de los LT, ocurre una acumulación de moléculas de MHC y moléculas co-estimuladoras en las DC y una acumulación de TCRs en los LT que permite que ocurra la unión de los TCR con los complejos MHC-péptido, proceso esencial para la activación de los linfocitos. Además, dentro de esta estructura encontramos otras moléculas importantes para su mantención y funcionamiento, como son las moléculas de adhesión LFA-1 (en LT) e ICAM (en DC) (Bromley y cols., 2001; Dustin, 2014). Estudios anteriores de nuestro laboratorio indican que conexina 43 también participa de la SI, polarizando hacia ésta entre DC y LT CD4⁺ de manera antígeno dependiente y co-localizando con LFA-1. En este lugar, Cx43 forma comunicaciones mediadas por GJs entre las dos células, jugando un rol como coordinador de la maquinaria de señalización entre DC-LT, que regula la activación de los LT (Elgueta y cols., 2009; Mendoza-Naranjo y cols., 2011). Por otra parte, también se ha visto que Cx43 polariza hacia la sinapsis entre DC y células NK y hacia la sinapsis citolítica entre NK y células de melanoma, participando de la activación y citotoxicidad de las células NK (Tittarelli y cols., 2014). Así mismo, estudios recientes de nuestro laboratorio sugieren que Cx43 polariza hacia la zona de contacto entre LT CD8⁺ y células de melanoma de manera antígeno dependiente, participando del proceso de citotoxicidad contra éstas últimas

(Lillo, 2015). A partir de esto, quisimos estudiar si las GJ formadas por Cx43 jugarían un rol en la activación de LT CD8⁺.

Para ello, decidimos utilizar el modelo murino pMEL-1, el cual nos brinda un modelo antígeno específico donde los linfocitos a utilizar son vírgenes o “naïve”, permitiéndonos estudiar el priming de éstos a diferencia del modelo humano, donde es poco factible encontrar linfocitos T naïve específicos para un antígeno tumoral. Además, a diferencia de otros modelos murinos como el modelo OT-I, este modelo utiliza un antígeno asociado a melanoma, haciéndolo más representativo del contexto de una respuesta inmune antitumoral. En conjunto con las células dendríticas derivadas de médula ósea estos LT representan un buen modelo para el estudio del priming de linfocitos T CD8⁺. Nuestros resultados muestran que éstas células dendríticas tienen un fenotipo coincidente con el encontrado en la literatura (Lutz y cols, 1999; Mildner y Jung, 2014) y que son funcionales, activándose al ser estimuladas con LPS (Figura 4). Además, encontramos que tanto moDC como LT CD8⁺ pMEL-1 no presentan diferencias en la expresión de Cx43 respecto de su contraparte en bazo de ratones WT (Figura 5). Dado que el modelo no tiene alteraciones en la expresión de Cx43, esto nos da pie a considerar el modelo como un contexto “normal”, en donde la contribución de Cx43 al fenómeno de activación será representativo de lo que ocurre en la activación de linfocitos T CD8⁺ normalmente.

Respecto de la determinación de condiciones de activación de estos linfocitos, encontramos que éste modelo es muy sensible, donde existe activación linfocitaria con baja concentración de péptido utilizado para el pulso de las células dendríticas. Determinamos que 0,5 uM es una concentración ideal para realizar estos ensayos, ya que permite la activación de virtualmente todos los linfocitos a los días 1 y 3, sin ser una concentración saturante. Esto nos permitirá observar los efectos que las GJ-Cx43

podrían tener en la activación de LT CD8⁺, sin que sean opacadas por una sobreactivación del sistema (Figura 6). Además, encontramos que estos linfocitos no requieren de la presencia de IL-2 en el cultivo para su activación, lo cual podría deberse a la alta afinidad que tiene el TCR de estos linfocitos con el péptido hgp100 (Overwijk y cols., 2003).

Por otra parte, encontramos que en este modelo existe transferencia de calceína entre moDC y LT CD8⁺ pMEL-1, lo que nos indica que existiría acoplamiento celular y comunicación entre ellas (Figura 9). Ya que esta transferencia ocurre en el caso en que usamos moDC pulsadas con el péptido hgp100 y LT CD8⁺ pMEL-1, pero no en los controles de especificidad, podemos determinar que este acoplamiento está dado sólo en un contexto antígeno específico. Esto coincide con lo encontrado en la literatura para otros modelos. El reclutamiento de Cx43 al sitio de contacto entre las células es un fenómeno que ocurre en el momento de la formación de la SI, la cual ocurre sólo cuando el contacto célula-célula se da en un contexto antígeno específico, es decir, es antígeno dependiente (Mendoza-Naranjo y cols., 2011; Bromley y cols., 2001). De esta manera, la formación de placas de GJ y consecuente comunicación, sólo ocurrirá cuando exista reconocimiento del complejo MHC-péptido en las DC por parte de los TCR en los LT. Como controles de especificidad utilizamos dos modelos: moDC pulsadas con el péptido de la proteína OVA, SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) co-cultivadas con linfocitos T CD8⁺ pMEL-1 y moDC pulsadas con el péptido hgp100 co-cultivadas con linfocitos T CD8⁺ obtenidos de ratones WT. Estos dos controles de especificidad nos confirman que los fenómenos observados en nuestros estudios son de naturaleza antígeno específica. En el primer caso, el péptido presentado en las moléculas de MHC-I de las moDC es un péptido irrelevante para el modelo. Los TCR de los LT CD8⁺ pMEL-1 son específicos para el péptido hgp100, por lo que no ocurrirá reconocimiento

del antígeno. En el segundo caso, los linfocitos de un ratón WT no son específicos, existen múltiples TCRs posibles específicos para un sin fin de antígenos y sólo una pequeña fracción de la población posiblemente tendrá un TCR que reconocerá el antígeno. En ambos casos, habrá formación de conjugados moDC/LT, pero no habrá formación de SI, no habrá reclutamiento de Cx43 al sitio de la SI, no existirá formación de GJ funcionales y consecuentemente no habrá transferencia de calceína entre dichas células.

Para determinar si las GJ-Cx43 juegan un rol en la activación de LT CD8⁺ pMEL-1 realizamos ensayos de activación y de transferencia de calceína entre moDC y LT CD8⁺ pMEL-1, en presencia del péptido mimético de Cx43 Gap 27. Este péptido se une a los hemicanales formados por Cx43 y bloquea el canal de GJ que ésta forma (Evans y Boitano, 2001; Evans y Leybaert, 2007). Es de esperar que si Cx43 juega un rol en la activación de éstos linfocitos, el bloqueo de su funcionamiento normal altere el proceso y consecuentemente observemos una disminución de la activación de éstos. Sin embargo, nuestros resultados no muestran lo esperado (Figuras 10 y 11). En efecto, se observa que al utilizar el péptido inhibidor no existen diferencias en la activación de los linfocitos respecto del control. Esto podría indicar que Cx43 no juega un papel relevante en el proceso de activación de los LT. Sin embargo, llama la atención que en el caso de la transferencia de calceína, si se observa comunicación en un contexto antígeno específico aunque no ocurra una disminución de la comunicación entre éstas células al inhibir Cx43. Esto indicaría que existe otro proceso dependiente de antígeno capaz de generar la transferencia de calceína desde la moDC hacia el LT o que podría existir otra conexina involucrada en el proceso. Sin embargo, estudios anteriores de nuestro laboratorio y otros investigadores apuntan fuertemente a que Cx43 potencialmente tendría un rol en este proceso (Elgueta y cols., 2009; Mendoza-Naranjo

y cols., 2011). Además, la mayoría de las isoformas de conexina se expresan estrictamente de forma tejida específica, mientras que Cx43 se expresa ubicuamente y es la isoforma de conexina que se encuentra mayormente representada en células del sistema inmune. Se ha visto que está involucrada en diferentes procesos inmune, tales como la transferencia de antígenos entre DC y la presentación cruzada de éstos (Mendoza-Naranjo y cols., 2007), la activación de LT CD4⁺ (Mendoza-Naranjo y cols., 2011), actividad inhibitoria de linfocitos T reguladores (Boop y cols., 2007) y citotoxicidad de células NK (Tittarelli y cols., 2014), entre otras, por lo que decidimos determinar si el péptido utilizado en nuestros experimentos se encontraba en óptimo funcionamiento antes de llegar a cualquier conclusión.

Para ello, realizamos ensayos utilizando dos modelos en donde se ha visto que existe expresión de Cx43 y comunicación mediada por GJ entre las células: HEK-293 y modelo moDC/LT CD4⁺ OT-II (Sroka y cols. 2008; Elgueta y cols., 2009; Mendoza-Naranjo y cols., 2011). A diferencia de lo que encontramos en la literatura, en ambos ensayos no se observó disminución de la transferencia de calceína al utilizar el péptido inhibitor, respecto de la condición control (ScrG27) y la condición sin tratamiento (Figuras 12 y 13). Ya que sabemos que en ambos modelos la inhibición de Cx43 produce una disminución de la comunicación entre las dos células, podemos deducir que el péptido mimético de Cx43 Gap 27 utilizado en nuestro modelo experimental no se encuentra funcionando de manera óptima, ya que no bloquea las GJ-Cx43, por lo que no podemos descartar la participación de estas conexinas en los procesos de activación celular. Es por esto que para experimentos venideros proponemos utilizar un siRNA (*small interfering RNA*) contra Cx43. Los siRNA son una clase de RNA de doble hebra de 20-25 pares de bases de largo que operan por la vía de los RNAs de interferencia. Como su nombre lo dice, estos RNA interfieren con la expresión de

genes específicos con secuencia nucleotídica complementaria a éstos mediante la degradación de los mRNA luego de su transcripción, resultando en que los mRNA no pueden ser transcritos (Agrawal y cols., 2003). En este caso, se propone utilizar el siRNA contra Cx43 para disminuir la expresión de esta proteína tanto en LT como moDC y con ello disminuir la formación de GJ entre éstas células. Este siRNA ha sido utilizado anteriormente en otros modelos y ha demostrado ser capaz de inhibir la expresión de Cx43 (Genetos y cols., 2007; Ogawa y cols., 2012), por lo que creemos que se puede establecer un protocolo para su utilización en el modelo de estudio en el cual estamos trabajando. Actualmente, en nuestro laboratorio contamos con este siRNA, el cual ha sido utilizado exitosamente en la disminución de la expresión de Cx43 en la línea de melanoma murino B16-F10 y nos encontramos desarrollando un protocolo de transfección de moDCs que ha mostrado resultados prometedores. Esto solucionaría el problema del uso de un péptido inhibidor, ya que podremos comparar la condición en donde Cx43 está presente y se expresa de manera normal en las células, con una en donde la probabilidad de formación de GJ-Cx43 será más baja, ya que las células expresarán menor cantidad de Cx43 y con ellos existirá menor comunicación entre estas células. Además, haciendo combinaciones de co-cultivos de células normales con células tratadas con siRNA, podremos determinar la contribución de las GJ y hemicanales de cada tipo celular (LT y moDC) al proceso de activación, permitiéndonos obtener mayor información sobre factores determinantes y la contribución de las GJ para el proceso.

Dentro de las proyecciones y perspectivas de este seminario de título, se encuentra adentrar en el rol que podrían cumplir las GJ en el proceso de activación de linfocitos T y posteriormente en su fase efectora. Más específicamente, queremos

estudiar los mediadores solubles en la comunicación intercelular mediada por GJ. Con esto queremos determinar posibles moléculas y segundos mensajeros que podrían ser transferidos por GJ, que participen en los procesos de activación y citotoxicidad de linfocitos T CD8⁺. Además, dada la importancia de las mitocondrias como fuente de segundos mensajeros, proponemos estudiar si existe polarización de mitocondrias hacia el sitio de la sinapsis inmunológica, con el fin de determinar su participación en los procesos antes mencionados. En nuestro laboratorio ya hemos establecido un modelo murino de linfocitos T citotóxicos utilizando el mismo ratón transgénico que utilizamos para este seminario de título: pMEL-1 (Overwijk y cols., 2003). Estos CTLs son generados a partir de esplenocitos totales y cultivados en presencia del péptido hgp100 e IL-2. Una vez terminado el cultivo éstos linfocitos son CD8⁺ Vβ13⁺CD25⁺ CD44⁺ y productores de IFN-γ. Éstos, en conjunto con B16-F10, la cual es una línea de melanoma murino que expresa gp100 y es reconocida por los CTL pMEL-1, nos permite tener un modelo murino antígeno específico para el estudio de las GJ en la fase de citotoxicidad de LT CD8⁺ que presenta ventajas técnicas respecto del modelo humano y nos permite un mejor manejo de las variables a considerar en próximos experimentos. En este momento se encuentra en desarrollo un seminario de título abarcando este tema, en donde se pretende determinar la importancia de Cx43 en la sinapsis citolítica formada durante la fase de citotoxicidad de CTL contra células de melanoma. En conjunto, estos estudios nos permitirían dilucidar el mecanismo de acción de las GJ en la sinapsis inmunológica tanto en la fase de activación como citotoxicidad de LT CD8⁺ y de esta manera entender la importancia de éstas en la regulación de la respuesta inmune antitumoral.

CONCLUSIONES

A partir del trabajo realizado en este seminario de título, observamos que el modelo moDC/LT CD8⁺ pMEL-1 no posee alteraciones en la expresión de Cx43, respecto de su contraparte WT. Además, determinamos que los LT CD8⁺ pMEL-1 se activan tempranamente, incluso desde 1 hora de co-cultivo, sin necesidad de agregar IL-2 al cultivo. Por otra parte, encontramos que moDC pulsadas con el péptido hgp100 y LT CD8⁺ pMEL-1 se acoplan y comunican en un contexto estrictamente antígeno específico. A partir de los resultados obtenidos no podemos determinar si Cx43 juega un rol en la activación de LT CD8⁺, ya que no encontramos inhibición de la comunicación entre éstas células al utilizar el péptido mimético de Cx43 Gap 27. Nuestros resultados de ensayos realizados en modelos anteriormente probados, indican que el Gap 27 no se encontraría en óptimo funcionamiento. A partir de esto, proponemos utilizar un siRNA contra Cx43 para ensayos posteriores que nos permitan dilucidar si existe un rol de GJ-Cx43 en la activación de LT CD8⁺ para luego estudiar la naturaleza de las moléculas transferidas en este proceso y con esto dilucidar el mecanismo en el cual se encuentran involucradas las conexiones tipo GJ en el proceso de activación de la respuesta inmune antitumoral.

BIBLIOGRAFÍA

- Aasen T, Mesnil M, Naus CC, Lampe PD, Laird DW.** (2016) Gap junctions and cancer: communicating for 50 years. *Nat Rev Cancer*, 16:775-788. doi:10.1038/nrc.2016.105.
- Abbaci M., Barberi-Heyob M., Blondel W., Guillemin F., Didelon J.** (2008) Advantages and limitations of commonly used methods to assay the molecular permeability of gap junctional intercellular communication. *Biotechniques*. 45(1):33-52, 56-62. doi: 10.2144/000112810.
- Abbas, Lichman y Pillai** (2012) Activación de linfocitos T en Inmunología celular y molecular (205-208). Elsevier, España.
- Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., & Mukherjee, S. K.** (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 657-685.
- Andersen, M. H., Schrama, D., Thor Straten, P., & Becker, J. C.** (2006). Cytotoxic T cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(1), 32-41.
- Babbitt BP, Allen PM, Matsueda G, Haber E, Unanue ER.** (1985). Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature.*, 317: 359-61.
- Bopp T, Becker C, Klein M y cols.** (2007) Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 204:1303-1310.
- Bromley, S. K., Burack, W. R., Johnson, K. G., Somersalo, K., Sims, T. N., Sumen, C., ... & Dustin, M. L.** (2001). The immunological synapse. *Annual review of immunology*, 19(1), 375-396.
- Carette D, Gilleron J, Chevallier D, Segretain D, Pointis G.** (2014) Connexin a check-point component of cell apoptosis in normal and physiopathological conditions. *Biochimie* 101:1-9.
- Cascio WE, Yang H, Muller-Borer BJ, Johnson TA.** (2005) Ischemia-induced arrhythmia: the role of connexins, gap junctions, and attendant changes in the impulse propagation. *J Electrocardiol*, 38(5):55-59.
- Chanson M, Derouette JP, Roth I, Foglia B, Scerri I, Dudez T, Kwak BR.** (2005) Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. *Biochim Biophys Acta*, 1711(2):197-207.
- Chaplin, D.D.** (2010). Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S3-S23.
- Delmar M, Makita N.** (2012) Cardiac connexins, mutations and arrhythmias. *Curr Opin Cardiol* 27:236-41.
- Dustin, M. L.** (2014). The immunological synapse. *Cancer immunology research*, 2(11), 1023-1033.
- Elgueta, R., J.A. Tobar, K.F. Shoji, J. De Calisto, A.M. Kalergis, M.R. Bono, M. Roseblatt, J.C. Saez** (2009). Gap junctions at the dendritic cell-T cell interface are key elements for antigen-dependent T cell activation. *J Immunol.* 183: 277-284.

- Evans, W. H., y Boitano, S.** (2001). Connexin mimetic peptides: specific inhibitors of gap-junctional intercellular communication. 606-612.
- Evans, W. H., y Leybaert, L.** (2007). Mimetic peptides as blockers of connexin channel-facilitated intercellular communication. *Cell communication & adhesion*, 14(6), 265-273.
- Falk, M., Baker, S., Gumpert, A.** (2009) Gap Junction turnover is achieved by the internalization of small endocytic double-membrane vesicles. *Mol Biol cell*. 15; 20(14): 3342–3352.
- Fonseca, PC., Nihei OK., Savino W., Spray DC., Alves LA.** (2006) Flow cytometry analysis of gap junction-mediated cell-cell communication: advantages and pitfalls. *Cytometry A*. Jun;69(6):487-93.
- Gajewski, T. F., Schreiber, H., Fu, Y. X.** (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature immunology*, 14(10): 1014-1022.
- Genetos, D. C., Kephart, C. J., Zhang, Y., Yellowley, C. E., & Donahue, H. J.** (2007). Oscillating fluid flow activation of gap junction hemichannels induces ATP release from MLO-Y4 osteocytes. *Journal of cellular physiology*, 212(1), 207-214.
- Glass AM, Snyder EG, Taffet SM.** (2015) Connexins and pannexins in the immune system and lymphatic organs. *Cell Mol Life Sci* 72:2899-910.
- Gleisner M.A., Navarrete M., Hofmann F., Salazar-Onfray F., and Tittarelli A.** (2017) Mind the Gaps in Tumor Immunity: Impact of Connexin-Mediated Intercellular Connections. *Front. Immunol.* 2017. 8:1067.
- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML.** (1999) The immunological synapse: A molecular machine controlling T cell activation. *Science.*, 285: 221–7.
- Helft, J., Böttcher, J., Chakravarty, P., Zelenay, S., Huotari, J., Schraml, B.U., Goubau, D., and Reis e Sousa, C.** (2015). GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c+MHCII+ Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* 42, 1197–1211.
- Ilvesaro, J., Tavi, P., y Tuukkanen, J.** (2001). Connexin-mimetic peptide Gap 27 decreases osteoclastic activity. *BMC musculoskeletal disorders*, 2(1), 10.
- Junger, W.** (2011) Immune cell regulation by autocrine purinergic signaling. *Nature Reviews Immunology*. 11: 201-211.
- Lewis RS., y cols.** (2001) Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol.*, 19: 497–521.
- Lillo, F.** (2016) Participación de las comunicaciones intercelulares tipo Gap Junctions en la citotoxicidad de linfocitos T CD8⁺ contra células de melanoma. Santiago, Chile. Presentado en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile para la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.
- Lutz, M.B., Kukutsch, N., Ogilvie, A.L.J., Rößner, S., Koch, F., Romani, N., and Schuler, G.** (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* 223, 77–92.
- Kandouz M., Batist G.** (2010) Gap junctions and connexins as therapeutic targets in

cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 14(7): 681–92. Review.

Kotini M, Mayor R. (2015) Connexins in migration during development and cancer. *Dev Biol* 401:143-51.

Krysko DV, Leybaert L, Vandenabeele P, D'Herde K. (2005) Gap junctions and the propagation of cell survival and cell death signals. *Apoptosis* 10:459-69.

Martínez-Lostao L., Anel A., Pardo J. (2015) How do cytotoxic lymphocytes kill cancer cells? *Clin Cancer Res.*, 21(22):5047-56.

Matsue, H., Yao, J., Matsue, K., Nagasaka, A., Sugiyama, H., Aoki, R., ... & Shimada, S. (2006). Gap junction-mediated intercellular communication between dendritic cells (DCs) is required for effective activation of DCs. *The Journal of Immunology*, 176(1), 181-190.

Mellman I. y Steinman RM. (2001) Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, 106(3): 255-258.

Mendoza-Naranjo, A., Saéz, P. J., Johansson, C. C., Ramírez, M., Mandaković, D., Pereda, C., ... y Salazar-Onfray, F. (2007). Functional gap junctions facilitate melanoma antigen transfer and cross-presentation between human dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 178(11): 6949-6957.

Mendoza-Naranjo, A., Bouma, G., Pereda, C., Ramírez, M., Webb, K. F., Tittarelli, A., ... y Salazar-Onfray, F. (2011). Functional gap junctions accumulate at the immunological synapse and contribute to T cell activation. *The Journal of Immunology*, 187(6): 3121-3132.

Mildner, A., and Jung, S. (2014). Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity* 40, 642–656.

Mogensen, T.H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 240–273, Table of Contents.

Naus CC. y Laird DW. (2010) Implications and challenges of connexin connections to cancer. *Nat Rev Cancer* 10:435-41.

Neijssen, J., B. Pang, J. Neefjes. (2007). Gap junction-mediated intercellular communication in the immune system. *Prog Biophys Mol Biol*, 94: 207-218.

Nielsen MS., Axelsen LN., Sorgen PL., Verma V., Delmar M., Holstein-Rathlou NH. (2012) Gap junctions. *Compr Physiol*, 2:1981-2035.

Ni, X., Wang, A., Zhang, L., Shan, L. Y., Zhang, H. C., Li, L., ... & Ma, K. T. (2017). Up-regulation of gap junction in peripheral blood T lymphocytes contributes to the inflammatory response in essential hypertension. *PloS one*, 12(9), e0184773.

Ogawa, K., Pitchakarn, P., Suzuki, S., Chewonarin, T., Tang, M., Takahashi, S., ... & Shirai, T. (2012). Silencing of connexin 43 suppresses invasion, migration and lung metastasis of rat hepatocellular carcinoma cells. *Cancer science*, 103(5), 860-867.

Overwijk, W.W., Theoret, M.R., Finkelstein, S.E., Surman, D.R., de Jong, L.A., Vyth- Dreese, F.A., DelleMijn, T.A., Antony, P.A., Spiess, P.J., Palmer, D.C., y cols. (2003). Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self- reactive CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 198, 569–580.

Oviedo-Orta, E., T Hoy, W. H. Evans. (2004). Gap junctions and connexin-mediated communication in the immune system. *Biochim Biophys Acta*, 1662: 102-112.

Oviedo-Orta, E., Perreau, M., Evans, W.H., y Potolicchio, I. (2010) Control of the proliferation of activated CD4⁺ T cells by connexins. *Journal of Leukocyte biology*, 88(1), 79-86.

Parkin, J., y Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, 357(9270), 1777-1789.

Pichi F, Lembo A, Serafino M, Nucci P. (2016) Genetics of Congenital Cataract. *Dev Ophthalmol* 57:1-14.

Sáez PJ., Shoji KF., Aguirre A., Sáez JC. (2014) Regulation of hemichannels and gap junction channels by cytokines in antigen-presenting cells. *Mediators Inflamm*, 12: 742734.

Shipkova, M., and Wieland, E. (2012). Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 413, 1338–1349.

Sroka, J., Czyż, J., Wojewoda, M., & Madeja, Z. (2008). The inhibitory effect of diphenyltin on gap junctional intercellular communication in HEK-293 cells is reduced by thioredoxin reductase 1. *Toxicology letters*, 183(1), 45-51.

Steinman RM. (2007). Dendritic cells: Understanding immunogenicity. *Eur J Immunol*. 37: S53–60.

Shaw, R. M., Fay, A. J., Puthenveedu, M. A., von Zastrow, M., Jan, Y. N., y Jan, L. Y. (2007). Microtubule plus-end-tracking proteins target gap junctions directly from the cell interior to adherens junctions. *Cell*, 128(3), 547-560.

Tittarelli, A., Mendoza-Naranjo, A., Farías, M., Guerrero, I., Ihara, F., Wennerberg, E., ... y Salazar-Onfray, F. (2014). Gap junction intercellular communications regulate NK cell activation and modulate NK cytotoxic capacity. *The Journal of Immunology*, 192(3): 1313-1319.

Tittarelli, A., Guerrero, I., Tempio, F., Gleisner, MA., Avalos, I., Sabanegh, S., ... y Salazar-Onfray, F. (2015). Overexpression of connexin 43 reduces melanoma proliferative and metastatic capacity. *British Journal of Cancer*, 113: 259-267.

Trautmann, A. y Valitutti, S. (2003). The diversity of immunological synapses. *Current opinion in immunology*, 15(3), 249-254.

Veeraraghavan R, Poelzing S, Gourdie RG. (2014) Intercellular electrical communication in the heart: a new, active role for the intercalated disk. *Cell Commun Adhes*, 21:161-7.

Wingard JC, Zhao HB. (2015) Cellular and Deafness Mechanisms Underlying Connexin Mutation-Induced Hearing Loss - A Common Hereditary Deafness. *Front Cell Neurosci* 9:202.

Wülfing, C., y Davis, M. M. (1998). A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science*, 282(5397), 2266-2269.

Zsiros V, Aradi I, Maccaferri G. (2007) Propagation of postsynaptic currents and potentials via gap junctions in GABAergic networks of the rat hippocampus. *J Physiol*, 578:527-44.

ANEXO

Durante el desarrollo de este seminario de título nuestro laboratorio publicó un artículo en la revista *Frontiers in Immunology*, el cual se titula *Mind the Gaps in Tumor Immunity: Impact of Connexin-Mediated Intercellular Connections (2017)*, doi:10.3389/FIMMU.2017.01067, donde este seminario se ve involucrado. Este artículo se adjunta a continuación.