

UCH-FC  
Biotecnología  
L 729  
C. 1



Universidad de Chile – Facultad de Ciencias – Escuela de Pregrado

**“Participación de las comunicaciones intercelulares tipo Gap Junctions en la  
citotoxicidad de linfocitos T CD8+ contra células de melanoma”**

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

**Fernando Andrés Lillo Vera**

Director del Seminario de Título:

Dr. Flavio Andrés Salazar Onfray

Directora Patrocinante:

Dra. Daniela Sauma Mahaluf

Agosto 2016

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 el candidato:

**Sr. Fernando Andrés Lillo Vera**

**“Participación de las comunicaciones intercelulares tipo Gap Junctions en la citotoxicidad de linfocitos T CD8+ contra células de melanoma”**

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Flavio Andrés Salazar Onfray  
**Director Seminario de Título**

Dra. Daniela Sauma Mahaluf  
**Profesor Patrocinante del Seminario**

#### **Comisión Revisora y Evaluadora**

Dra. María Rosa Bono Merino  
**Presidente**

Dra. Claudia Stange Klein  
**Evaluador**

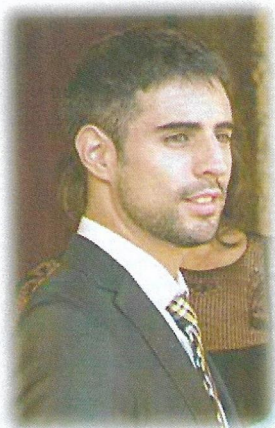
Una firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal, acompañada de un sello circular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. El sello contiene el texto "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIOTECNICA" y "CENTRAL" rodeado por "U. DE CHILE" y dos estrellas.

Una firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal, correspondiente a la Dra. María Rosa Bono Merino.

Una firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal, correspondiente a la Dra. Claudia Stange Klein.

Santiago de Chile, Agosto de 2016

## II. Biografía



Fernando Lillo Vera nació el 23 de Octubre de 1991.

Ingreso al colegio Seminario Pontificio Menor, comuna de Las Condes, en el año 1994 donde curso desde Kínder hasta 4° medio graduándose el en año 2009.

Desde pequeño presento aptitudes para el deporte destacándose en la gimnasia olímpica que practico durante 3 años en el Centro de Alto Rendimiento, luego realizo natación durante 2 años en el Complejo Deportivo Santa Rosa de Las Condes hasta los 10 años de edad.

Cuando entro a cursar 4° básico ingreso al grupo Scout Rucamanqui de su colegio donde participo por 6 años para después ingresar a la pastoral de su colegio donde participo de las misiones que esta realizaba en lugares de difícil acceso.

El año 2009 realizo la Prueba de Selección Universitaria con la cual ingreso en el año 2010 a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile, de la cual egreso y obtuvo el grado de licenciado en el año 2014

Desde el año 2014 hasta la actualidad realizo su trabajo de Seminario de Título en el Laboratorio de Inmunología Anti Tumoral a cargo del Dr. Flavio Salazar Onfray en la facultad de medicina de la Universidad de Chile.

### III. Índice de Contenidos

<b>Biografía</b>	<b>II</b>
<b>Índice de contenidos</b>	<b>III</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>V</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>VI</b>
<b>Resumen</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
➤ Cáncer y Melanoma	<b>1</b>
➤ Respuesta inmune contra tumores	<b>4</b>
➤ Gap Junctions	<b>7</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>11</b>
<b>Objetivos</b>	<b>11</b>
➤ Objetivo general	<b>11</b>
➤ Objetivos específicos	<b>11</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>12</b>
➤ Células y reactivos	<b>12</b>
➤ Microscopía de epifluorescencia	<b>13</b>
➤ Transferencia de Calceína	<b>14</b>
➤ Ensayo citotóxico de liberación de [ <sup>51</sup> Cr]	<b>14</b>
➤ Análisis estadístico	<b>15</b>

<b>Resultados</b>	<b>16</b>
➤ Conexina 43 se polariza en la zona de la sinapsis inmunológica entre Linfocitos T citotóxicos y células tumorales	<b>16</b>
➤ Formación de Gap Junctions-Cx43 funcionales en la zona de la sinapsis inmunológica entre LT CD8 <sup>+</sup> citotóxicos y células tumorales	<b>19</b>
➤ Las comunicaciones intercelulares mediadas por Cx43 contribuyen a la actividad citotóxica de LT CD8 <sup>+</sup> contra células tumorales	<b>22</b>
<b>Discusión</b>	<b>25</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>29</b>
<b>Referencias</b>	<b>30</b>

## Resumen

Las Gap Junctions (GJ) son canales intercelulares que permiten la comunicación entre células adyacentes, y participan en importantes procesos biológicos tales como el balance homeostático, proliferación, diferenciación y muerte celular. Están formadas por 2 estructuras llamadas conexones, y cada conexón está compuesto por 6 subunidades llamadas conexinas (Cx), siendo Cx43 la proteína más expresada en células del sistema inmune en mamíferos. La comunicación por contacto físico entre células del sistema inmune es primordial tanto en la activación de los linfocitos como en el reconocimiento de las células blanco. Publicaciones previas de nuestro laboratorio han demostrado que las GJ compuestas de Cx43 (GJ-Cx43) se polarizan en el sitio de interacción entre células dendríticas (DC) y linfocitos T (LT) durante la sinapsis inmunológica y que participan en la presentación cruzada de antígenos de melanoma por parte de DCs humanas favoreciendo la activación de LT CD8<sup>+</sup> antígeno-específicos. Posteriormente, se estableció que la formación de GJ-Cx43 son importantes para la activación y citotoxicidad de las células Natural Killer (NK) contra células de melanoma. Basado en los antecedentes expuestos, y en la similitud funcional entre células NK y LT CD8<sup>+</sup>, en este trabajo proponemos que: las comunicaciones intercelulares tipo Gap Junctions formadas por Cx43 participan en la citotoxicidad de linfocitos T CD8<sup>+</sup> contra células de melanoma. Para comprobar esta hipótesis, realizamos co-cultivos de linfocitos T CD8<sup>+</sup> con células de melanoma, y determinamos en ellos la polarización de Cx43 hacia el sitio de interacción mediante microscopía, la formación de canales funcionales mediante ensayos de transferencia de Calceína, y estudiamos el efecto del bloqueo específico de los canales

GJ-Cx43 en la citotoxicidad de los LT CD8<sup>+</sup>. Nuestros resultados indican que Cx43 se polariza hacia el sitio de contacto entre LT CD8<sup>+</sup> y células de melanoma formando placas de Cx43, las cuales forman GJ funcionales. Finalmente, demostramos que las GJ-Cx43 son importantes en la función efectora de los LT CD8<sup>+</sup> contra células de melanoma, ya que la inhibición específica de estos canales durante la interacción de estas células, reduce significativamente la capacidad citotóxica de los LT CD8<sup>+</sup>.

En resumen, nuestros resultados muestran que las comunicaciones intercelulares mediadas por Gap Junctions participan en los procesos citotóxicos de eliminación de células tumorales por parte de LT CD8<sup>+</sup>. Estos resultados podrían ser relevantes para el diseño de nuevas estrategias inmunoterapéuticas, permitiendo direccionar futuras investigaciones biomédicas que involucren el rol de las conexinas en la sinapsis inmunológica de la respuesta inmune antitumoral.

## Abstract

Gap Junctions intercellular communication (GJ) allow the communication between adjacent cells, and are involved in important biological process such as the homeostatic balance, proliferation, differentiation and cell death. GJ are composed by two structures called connexons, and each connexon is formed by 6 subunits called connexins (Cx), being Cx43 the most expressed in immune cells in mammals. The communication by physical contact between cells of the immune system is essential for processes that include the activation of lymphocytes and the recognition of the target cell. Previous reports from our laboratory have shown that GJ composed of Cx43 (GJ-Cx43) are polarized to the site of interaction between dendritic cells and T lymphocytes during the immunological synapse, where it participates in the cross-presentation of melanoma antigens by human DCs to specific CD8<sup>+</sup> T cells. Subsequently, we established that the formation of GJ-Cx43 is important for the activation and cytotoxicity of Natural Killer cells (NK) against melanoma cells. Based on this evidence, and based on the functional similarity between NK cells and CD8<sup>+</sup> T cells, we propose that Gap Junctions intercellular communication formed by Cx43 participate in the cytotoxicity of CD8<sup>+</sup> T cells against melanoma cells. To test this hypothesis, we performed co-cultures of CD8<sup>+</sup> T cells with melanoma cells, and determined the polarization of Cx43 to the contact site by microscopy, the formation of functional channels by calcein transfer assays, and the effect of specific blockade of the channels in the cytotoxicity of CD8<sup>+</sup> T cells. Our results indicate that Cx43 polarize to the contact site between CD8<sup>+</sup> T cells and melanoma cells forming plaques of Cx43, which form functional GJ. Finally, we demonstrate that GJ-Cx43 are important in the effector functions of CD8<sup>+</sup> T cells against melanoma cells, because a specific inhibition of these



channels during the interaction of these cells significantly reduced the cytotoxic capacity of CD8<sup>+</sup> T cells to kill a target cell.

In summary, our results show that Gap Junctions intercellular communication participate in the cytotoxic processes of tumor cell elimination by CD8<sup>+</sup> T cells. These results could be relevant for the design of novel immunotherapeutic strategies, highlighting the relevance of biomedical research related to this field in the immunological synapse of the antitumoral immune response.



#### IV. Índice de Figuras

**Figura 1.** Distribución de Cx43 en la sinapsis inmunológica

**Figura 2.** Estrategia de análisis para ensayo de transferencia de Calceína

**Figura 3.** Formación de Gap Junctions funcionales entre linfocitos T CD8+ y células de melanoma

**Figura 4.** Canales GJs formadas de Cx43 contribuyen a la citotoxicidad de los LT CD8+ contra células tumorales

## V. Lista de Abreviaturas

[<sup>51</sup>Cr]: radio isotopo de cromo

ATP: adenosín trifosfato

BSA: albúmina sérica bovina

Ca<sup>+2</sup>: ion calcio

cAMP: adenosín monofosfato cíclico

CCB: carcinoma de células basales

CCE: carcinoma de células escamosas

CD25: cluster of differentiation 25, cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2

CD3: cluster of differentiation 3, co-receptor de las células T

CD4: cluster of differentiation 4, co-receptor de señalización y adhesión de linfocitos T restringido a MHC-II

CD69: cluster of differentiation 69, proteína de señalización involucrada en la proliferación de los linfocitos

CD8: cluster of differentiation 8, co-receptor de señalización y adhesión de linfocitos T restringido a MHC-I

CTL: linfocito T citotóxico

CTLA-4: receptor asociado con la regulación de la respuesta inmune

Cx: conexina

Cx43: Conexina 43

DC: célula dendrítica

DAMP: patrón molecular asociado a daño

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

DTIC: dacarbazina

FDA: agencia de alimentos y medicamentos

FMS: línea celular de melanoma

FMS-Cx43: línea celular FMS transfectada con el gen Cx43

GJ: Gap Junction

GJ-Cx43: Gap Junction formada por Cx43

GJIC: comunicaciones intercelulares tipo Gap Junctions

IL-1 $\beta$ : interleuquina 1  $\beta$

IL-2: interleuquina 2

IMF: intensidad media de fluorescencia

IFN- $\gamma$ : interferón  $\gamma$

K562: línea celular de cáncer de linfoma

LB: linfocito B

LT: linfocito T

MART-1: antígeno de melanoma reconocido por células T

MHC: complejo principal de histocompatibilidad

NK: célula natural killer

PAMP: patrón molecular asociado a patógeno

PBS: tampón fosfato salino

PD-1: proteína de muerte celular programada 1

PD-L1: ligando de proteína de muerte celular programada 1

SFB: suero fetal bovino

TRC: receptor de los linfocitos T

## **Introducción**

### **Cáncer y Melanoma**

El cáncer es un problema de salud mundial, ya que representa una de las primeras causas de muerte en el mundo con 8,2 millones de muertes en el año 2012 (American Cancer Society, 2015). En Chile también lo es, ya que corresponde a la segunda causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares, con 22 mil muertes en el año 2008 (Aguilera y col., 2013).

El cáncer se define como un grupo de enfermedades producidas por la división descontrolada de células anormales con la potencialidad de invadir otros tejidos del cuerpo generando daño (Stratton y col., 2009). En un inicio, este crecimiento descontrolado forma una masa restringida o un tumor benigno, mientras que cuando esta masa adquiere la capacidad de hacer metástasis, es decir de invadir otros tejidos, se conoce como tumor maligno. Existen distintos tipos de cáncer dependiendo de dónde se origine éste, cada uno de estos tumores poseen características distintas y evolucionan de manera diferente, sin embargo, si no son tratados, todos los cánceres llevan a un gran deterioro del individuo culminando en su muerte (Economopoulou y col., 2015).

El cáncer de piel es el cáncer más común en la población caucásica. En estadios tempranos se desarrolla en las capas más externas de la piel, pero si no es tratado a tiempo, puede invadir las capas más internas llegando a producir metástasis (Haque y col., 2015). Se clasifica en dos tipos según su origen: el cáncer de piel no melanoma y el melanoma. Dentro del primer grupo destacan el carcinoma de células basales (CCB) y el carcinoma

de células escamosas (CCE) pues son los que se presentan con mayor frecuencia. El CCB presenta un crecimiento lento, no pigmentado, con baja o sin tasa de metástasis, y el CCE generalmente genera una protuberancia rojiza de superficie áspera y escamosa que puede pasar a ser invasivo con un riesgo de 2-6% de metástasis (Jerant y col., 2000; Motley y col., 2002).

El melanoma en cambio, representa menos del 2% de todas las neoplasias cutáneas, sin embargo es el causante del 75% de todas las muertes por cáncer de piel en EEUU (American Cancer Society, 2015). Su incidencia ha aumentado considerablemente en Chile y el mundo, y se estima que las tasas de incidencia se duplican cada 10 años con un incremento anual del 7%, convirtiéndose en un problema de salud pública (Schwartz, 2011; Ferlay y col., 2015). El melanoma corresponde a un tumor neuroectodérmico maligno originado a partir de los melanocitos o células pigmentadas del iris, los cuales son células que derivan de la cresta neural y producen el pigmento melanina. Aparece principalmente en la superficie cutánea (melanoma cutáneo) aunque también puede presentarse en las mucosas, ganglios linfáticos y en las capas pigmentadas del bulbo ocular. Según el American Joint Committee on Cancer, el melanoma maligno presenta cuatro etapas de acuerdo al tamaño del tumor (considerando grosor y profundidad) y la presencia de metástasis. Las etapas I y II se conocen como estados tempranos, donde la etapa II ya presenta una profundidad mayor a 4 mm y ha comenzado a invadir el tejido. En estas etapas aún no existe metástasis y por ende, poseen un excelente pronóstico. Las etapas III y IV o estados avanzados presentan metástasis a linfonodos y otros órganos, lo

que empeora el pronóstico y el tiempo de supervivencia de los pacientes, el cual resulta ser en promedio menor a 10 meses (Balch y col., 2009).

Los tratamientos tradicionales para el melanoma maligno son la cirugía, la quimioterapia y radioterapia. La cirugía sólo resulta efectiva durante las etapas tempranas de la enfermedad, permitiendo tasas de supervivencia entre el 92 y 97% a 5 años, sin embargo, este porcentaje disminuye a un 40% en etapa III y a un 15% en etapa IV (Balch y col., 2009; Evans y col., 2013). La quimioterapia está basada principalmente en el uso de la Dacarbazina (DTIC) que inhibe la síntesis de DNA previniendo la división celular, de esta manera existe un retardo o detenimiento del crecimiento de las células tumorales. La radioterapia en cambio, utiliza la radiación ionizante (rayos X, gama o partículas como neutrones, electrones y protones, entre otros) directamente en el tumor destruyéndolo e impidiendo su crecimiento y proliferación. Las tasas de respuestas a la quimioterapia y radioterapia, fluctúan entre 5-15% sin embargo, ambos tratamientos producen efectos secundarios nocivos en los pacientes tratados debido a la falta de especificidad (Mandarà y col., 2006, Evans y col., 2013). Debido a que la detección temprana de este tipo de cáncer aumenta la eficacia de los diferentes tratamientos, y por ende mejora el pronóstico del paciente, se han desarrollado distintos sistemas de detección, el más conocido y efectivo corresponde a la utilización del acrónimo "ABCDE", el cual incorpora un análisis visual en relación a la Asimetría, Borde, Color, Diámetro y Evolución de esta neoplasia (Abbasi y col., 2004).

A pesar de los tratamientos y medidas de detección existentes, el melanoma maligno sigue afectando cada vez más a la población mundial, razón por la cual se deben desarrollar



nuevos tratamientos alternativos y/o complementarios a los actuales que controlen y traten de manera más eficaz la progresión de la enfermedad.

### **Respuesta inmune contra tumores**

El sistema inmune corresponde a un sistema multicelular altamente organizado diseñado tanto para ayudar a mantener la homeostasis del organismo como para proteger a éste de la invasión de patógenos y células malignas (Parkin & Cohen 2001, Storey & Jordan 2008). Las células del sistema inmune son capaces de reconocer agentes externos potencialmente dañinos, y detectar posibles anormalidades en las células propias del organismo, como ocurre en el caso de las neoplasias (Medzhitov & Janeway 2002). Este sistema se clasifica en innato y adaptable, los cuales presentan diferencias como lo son su respuesta no específica o específica, respectivamente, contra patógenos y antígenos. La inmunidad innata, corresponde a la primera línea de defensa del organismo, y es de rápida respuesta (ocurre en horas), cuyas células, tales como macrófagos, células dendríticas (DCs), células NK, granulocitos, entre otros, poseen receptores capaces de reconocer estructuras moleculares compartidas por varios grupos de organismos, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). El sistema inmune adaptativo, en cambio, se gatilla más lentamente, y genera memoria. Este sistema está conformado principalmente por linfocitos T (LT) y B (LB), cuyos receptores son producidos mediante recombinación somática de una serie de genes, mecanismo capaz de generar un enorme repertorio de receptores con distintas especificidades para el reconocimiento de antígenos (Abbas y col., 2008). Los LT se clasifican según el marcador de membrana que expresen y su función. Los LT CD4<sup>+</sup> o LT helper, reconocen antígenos específicos presentados en

el contexto de una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II y regulan la actividad de otros linfocitos y células del sistema inmune innato y adaptable mediante la secreción de citoquinas. En cambio los LT CD8<sup>+</sup>, o LT citotóxicos (CTL), reconocen antígenos específicos presentados en un contexto de moléculas de MHC de clase I y son capaces de lisar directamente a las células blanco que reconocen a través de su receptor de membrana (TCR) (Parkin & Cohen 2001, Storey & Jordan 2008, Aarntzen y col., 2013). Ambas respuestas, innata y adaptable, están finamente reguladas para reconocer lo extraño, evitar el reconocimiento de lo propio (Aarntzen y col., 2013), eliminar células tumorales y desencadenar una respuesta inmune efectiva (Parmani y col., 2003).

Cuando se desarrolla un tumor, las DCs, células presentadoras de antígenos profesionales, capturan y procesan antígenos derivados de las células tumorales en presencia de estímulos inmunogénicos (DAMPs) y migran hacia el órgano linfoide secundario más cercano llamado “linfonodo drenante de tumor”, donde activan LT vírgenes, es decir, células que no han tenido encuentro alguno con el antígeno para el cual expresan receptores específicos. Estos LT activados salen del linfonodo y viajan a través del torrente sanguíneo hasta llegar al lugar de residencia del tumor, donde son capaces de ejercer su acción con el fin de eliminar las células cancerígenas (Barchereau & Palucka 2005, Macintyre & Rathmell 2013).

Se ha descrito en múltiples publicaciones que los LT CD8<sup>+</sup> y las células NK son las principales células efectoras de las respuestas inmunes antitumorales (Shanker y col., 2007, Gajewski y col., 2013). El mecanismo por el cual estas células eliminan células

tumorales, es compartido. Ambas células poseen gránulos citotóxicos que contienen proteínas, tales como granzimas y perforinas, que son liberadas a la superficie de la célula diana, penetrando la membrana y gatillando la muerte celular (Voskoboinik y col., 2015). Al mismo tiempo que reconocen a la célula tumoral, tanto los LT CD8<sup>+</sup> como las células NK secretan elevados niveles de IFN- $\gamma$ , citoquina con gran efecto anti-tumoral (Ikeda y col., 2002, Yang y col., 2014).

El conocimiento de los procesos fisiológicos que sustentan la respuesta inmune contra tumores, ha permitido el desarrollo de tratamientos alternativos a los tradicionales, que ofrezcan menos efectos secundarios y mayor efectividad a pacientes con distintos tipos de cáncer. Dentro de estos tratamientos alternativos, el de mayor interés e investigación en los últimos años es la llamada inmunoterapia antitumoral. La inmunoterapia se refiere a la estimulación del propio sistema inmune del paciente para el rechazo y destrucción del tumor (Zitvogel y col., 2008). Dentro de esta clasificación, se han descrito algunas alternativas como la vacunación de pacientes con distintos tipos de cáncer con; DC cargadas con antígenos de melanoma, inyección de citoquinas que activan la respuesta inmune antitumoral como TNF- $\alpha$  e IL-2, y la inyección de LT CD8<sup>+</sup>. Algunas de estas inmunoterapias han logrado disminuir los efectos secundarios de las terapias tradicionales, e incluso se han obtenido resultados promisorios en ensayos clínicos de fase I, II sin embargo aún queda mucho por investigar.

Algunas inmunoterapias, particularmente los anticuerpos bloqueadores de puntos de chequeos, como el anti CTLA-4 y anti PD-L1/PD-1, han sido probados en su eficacia para

destruir tumores y prolongar la vida de los pacientes y han sido recientemente aprobados por la FDA para su uso en algunos tumores (Callahan y col., 2014).

## **Gap Junctions**

Desde la década de los 90, se comenzó a evidenciar el vínculo existente entre alteraciones en las comunicaciones intercelulares y el desarrollo de varias enfermedades, incluidas el cáncer. Desde entonces, nuestro laboratorio ha investigado el papel de los canales Gap Junction (GJ) en el sistema inmune y respuesta antitumoral.

Las GJ son canales intercelulares que permiten la comunicación entre células adyacentes. Están formadas por 6 proteínas de transmembrana llamadas conexinas (Cx), las cuales oligomerizan formando un hemicanal que se conoce como conexón (Goodenough y col., 1996). La unión de 2 conexones forma un canal que permite la comunicación intercelular mediada por Gap Junction (GJIC), las cuales permiten el intercambio bidireccional de iones y metabolitos que no superen 1 kDa de tamaño, como cAMP,  $\text{Ca}^{+2}$  y ATP entre otros (Nicholson, 2003, Neijssen y col., 2005). Estas propiedades conceden a las GJ la capacidad de regular importantes actividades celulares tales como la sinapsis eléctrica, el crecimiento y diferenciación celular. Se han identificado más de 20 tipos de conexinas en vertebrados que difieren en sus propiedades de masa y carga, lo que permite una selectividad y permeabilidad única para los conexones que conforman (Nguyen & Taffet 2009). Las conexinas poseen gran similitud estructural; 4 dominios de transmembrana, dos loops extracelulares, un loop citoplasmático y extremos amino y carboxilo terminal citoplasmáticos (Meşe y col., 2007). Las principales diferencias estructurales entre las

familias de conexinas se encuentran en los dominios citoplasmáticos, siendo éstos los principales sitios de regulación de la unión de los canales (Lampe & Lau 2000, Nicholson, 2003, Meşe y col., 2007).

Recientemente se ha demostrado que las GJs participan y modulan varios procesos inmunológicos, debido en parte, a que estos canales representan una de las principales formas de comunicación entre células del sistema inmune (Salzar-Onfray, 2013). El trabajo expuesto por Oviedo-Orta y col. (2001) demuestra que el bloqueo de los canales GJ provoca una reducción en la secreción de anticuerpos y de la producción de citoquinas en cultivos mixtos de LT y LB. Asimismo, Zahaler y col. (2003) comprueba que el bloqueo de las GJ entre neutrófilos y células endoteliales favorece la migración transendotelial de los neutrófilos, y Neijssen y col. (2005) confirma que las GJs favorecen la transferencia y la presentación cruzada de péptidos en monocitos activados. Actualmente, sabemos que prácticamente todas las células nucleadas con excepción de los espermatozoides y las células del músculo estriado adulto, expresan Cxs (Neijssen y col., 2007). Esto incluye a casi todas las células del sistema inmune, como neutrófilos, granulocitos, polimorfonucleares, DCs, macrófagos y linfocitos, sugiriendo que las conexinas modulan la respuesta inmune. Más aun, citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  inducen la expresión de Cxs en monocitos y macrófagos murinos (Neijssen y col., 2007) demostrándose una interacción de las Cxs con el sistema inmune.

En este contexto, publicaciones previas de nuestro laboratorio han demostrado que las Gap Junctions son importantes para la generación de respuestas inmunes antígeno-específica contra tumores. Ellas facilitan la transferencia directa de antígenos de

melanoma y la presentación cruzada de éstos en DCs humanas, permitiendo una eficaz activación de los LT (Tittarelli y col., 2014, Mendoza-Naranjo y col., 2007). En otro trabajo, se estableció que las GJ formadas por Cx43 (GJ-Cx43) participan en la sinapsis entre LT CD4<sup>+</sup> y DCs, modulando directamente la activación del LT (Mendoza-Naranjo y col., 2011). En este mismo trabajo, se demostró que Cx43 se polariza hacia el sitio de contacto de ambos tipos celulares formando canales GJ funcionales y que la inhibición específica de estos canales durante el co-cultivo de LT CD4<sup>+</sup> con DCs, disminuye los flujos de Ca<sup>+2</sup> en el linfocito, inhibiendo su activación (Mendoza-Naranjo y col., 2007, Mendoza-Naranjo y col., 2011).

Posteriormente, nuestro laboratorio demostró el papel de las GJ-Cx43 en la función efectora de las células NK contra células de melanoma y en el contexto de su activación con DC. En este trabajo se demostró que Cx43 se polariza a la zona de contacto entre las células NK y DCs, y entre las células NK y células de melanoma, formando GJ funcionales, las cuales permiten una comunicación de manera bidireccional. En concordancia con los resultados anteriores, se demostró que el bloqueo específico de las GJ-Cx43 inhibe la activación de las células NK, medido como la reducción de la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25 y en la liberación de IFN- $\gamma$ , sin alterar el fenotipo ni la función de las DCs. Interesantemente, el bloqueo de Cx43 inhibe la citotoxicidad de las células NK contra células tumorales, mecanismo asociado con la inhibición de la activación de granzima B y los flujos de Ca<sup>+2</sup> hacia las células tumorales. (Tittarelli y col., 2014). En base a los antecedentes expuestos y debido a la similitud funcional entre las células NK y LT CD8<sup>+</sup> previamente mencionadas, nos propusimos

investigar la participación de las GJIC formadas por Cx43 en la citotoxicidad de LT CD8<sup>+</sup> contra células de melanoma, procesos potencialmente relevantes para el diseño de nuevas estrategias inmunoterapéuticas.

## **Hipótesis**

Las comunicaciones intercelulares tipo Gap Junctions (GJIC) formadas por Cx43 favorecen la citotoxicidad de linfocitos T CD8<sup>+</sup> contra células de melanoma.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Investigar el papel de las comunicaciones intercelulares tipo Gap Junctions (GJIC) formadas por Cx43 en la función efectora de linfocitos T CD8<sup>+</sup> contra las células de melanoma.

### **Objetivos específicos:**

1. Analizar la polarización de Cx43 durante la interacción entre linfocitos T CD8<sup>+</sup> y células de melanoma mediante microscopía.
2. Determinar la funcionalidad de las comunicaciones intercelulares tipo GJ entre linfocitos T CD8<sup>+</sup> y células de melanoma por ensayos de transferencia de Calceína.
3. Estudiar la participación de las GJIC en la citotoxicidad de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> contra células de melanoma con ensayos de liberación de [<sup>51</sup>Cr].



## Materiales y métodos

### Células y reactivos

Los clones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos contra el antígeno MART-1 fueron generados previamente en nuestro laboratorio a partir de linfocitos infiltrantes de tumor de pacientes con melanoma.

La línea celular de melanoma FMS fue establecida previamente en nuestro laboratorio a partir de la biopsia de un paciente con melanoma maligno y la línea FMS-Cx43 fue obtenida de la transfección de la línea FMS con el gen Cx43 (Tittarelli y col., 2015).

Tanto FMS como FMS-Cx43, fueron descongeladas y resuspendidas en medio RPMI 1640 (Corning), suplementado con 10% suero fetal bovino (Corning) y 1% penicilina (100 U/L) (Corning) y estreptomycin (100 U/L) (Corning)), y fueron mantenidas en botellas de cultivo celular T75 y cultivadas a 37°C con una atmosfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

Los péptidos utilizados fueron: Gap20 (control) (secuencia: EIKKFKYGIEEHC; 98% pureza, JPT Peptide Technologies GmbH), 1848 (inhibidor de las GJ) (secuencia: CNTQQPGCENVCY; 98% pureza, JPT Peptide Technologies GmbH) y Péptido5 (inhibidor de hemicanales) (secuencia: VDCFLSRPTEKT; 98% pureza, JPT Peptide Technologies GmbH). Todos ellos fueron disueltos en DMSO a una concentración de 30 mM y utilizados a una concentración final de 300 µM. El cell-tracker Calceína-AM (Invitrogen) fue resuspendido en DMSO a una concentración de 1mM.



## Microscopía de epifluorescencia

Las células de melanoma fueron cultivadas en cover slip por 16 horas hasta una confluencia de 20-30%, y fueron co-cultivas con LT CD8<sup>+</sup> anti-MART-1 en placas de 24 pocillos por 30 minutos en una razón de 1:10. Posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% por 15 minutos y lavadas 3 veces con PBS 1x, para posteriormente ser incubadas con una solución 50mM de Cloruro de Amonio por 10 minutos. Seguidamente, las células fueron lavadas y permeabilizadas con Tritón 0,5% por 10 minutos, bloqueadas con albumina de suero bovino (BSA) 0,5% por 15 minutos e incubadas por 16 horas a 4°C con el anticuerpo policlonal de conejo anti-Cx43 (C6219; Sigma Aldrich) a una concentración de 1:1000. Transcurrido este tiempo, los co-cultivos fueron lavados 4 veces con PBS/BSA 0,5% e incubados por 1 hora 15 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario de burro anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (A21206; Life Technologies) a una concentración de 1:500. Finalmente las células fueron lavadas 5 veces con PBS/BSA 0,5% y marcadas con Hoechst 33342 (Thermo Scientific) a una concentración de 1:1000 por 15 minutos y montadas usando medio de montaje fluorescente (Dako North America).

Como control de especificidad del anticuerpo anti-Cx43, se realizó un marcaje solo con el anticuerpo secundario anti-conejo (Alexa Fluor 488). Como control de especificidad antigénica, se realizó un co-cultivo entre los LT CD8<sup>+</sup> con la línea tumoral de linfoma K562.

Las imágenes de los co-cultivos fueron tomadas con un microscopio invertido de epifluorescencia Olympus IX71 y analizadas con el software bioinformático ImageJ 1.43u.

### **Transferencia de Calceína**

Los LT CD8<sup>+</sup> fueron incubados con el anticuerpo anti-CD3 conjugado a PE/Cy7 (HIT3a; Biolegend) por 10 minutos a 4°C y posteriormente marcados por 30 minutos a 37°C con el cell-tracker Calceína-AM (0,7 μM). Luego las células fueron lavadas 2 veces, primero con PBS 1x y después con medio RPMI suplementado. Posteriormente se realizaron co-cultivos de LT CD8<sup>+</sup> con células de melanoma en una razón de 3:1 por 10 minutos a 37°C. Finalmente, las células fueron recolectadas e incubadas con 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) por 10 minutos a temperatura ambiente y adquiridas en un citómetro de flujo (FACSVerse, BD). La estrategia de análisis consistió en evaluar la transferencia de Calceína a las células de melanoma (Calceína<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup> y 7-AAD<sup>-</sup>). Las condiciones experimentales fueron: sin tratamiento, con DMSO, con Gap20, 1848 y Péptido5.

### **Ensayo citotóxico de liberación de [<sup>51</sup>Cr]**

Las células blanco o target (T), es decir, células de melanoma FMS y FMS-Cx43, fueron incubadas con [<sup>51</sup>Cr] (Perkin Elmer) por 45 minutos y posteriormente cultivadas (5000 células/pocillo) con LT CD8<sup>+</sup> o efectores (E) en distintas proporciones E:T (10:1, 5:1, 2.5:1) por 4 horas. Transcurrido este tiempo, la placa se centrifugó a 510 x g por 5 minutos, luego de lo cual se recolectó el sobrenadante. Las condiciones experimentales fueron: sin tratamiento, con DMSO, con Gap20, 1848 y Péptido5. En conjunto con lo anterior

también fueron realizados los controles de liberación espontánea y liberación máxima. Para la lectura de las cuentas, los sobrenadantes fueron incubados toda la noche con 250µl de líquido de centelleo y posteriormente, fue analizada la cantidad de [<sup>51</sup>Cr] en un lector de centelleo (TopCount NXT, PerkinElmer). El porcentaje de lisis específica fue obtenido con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ lisis específica} = \frac{(\text{liberación experimental}) - (\text{liberación espontánea})}{(\text{liberación máxima}) - (\text{liberación espontánea})} * 100$$

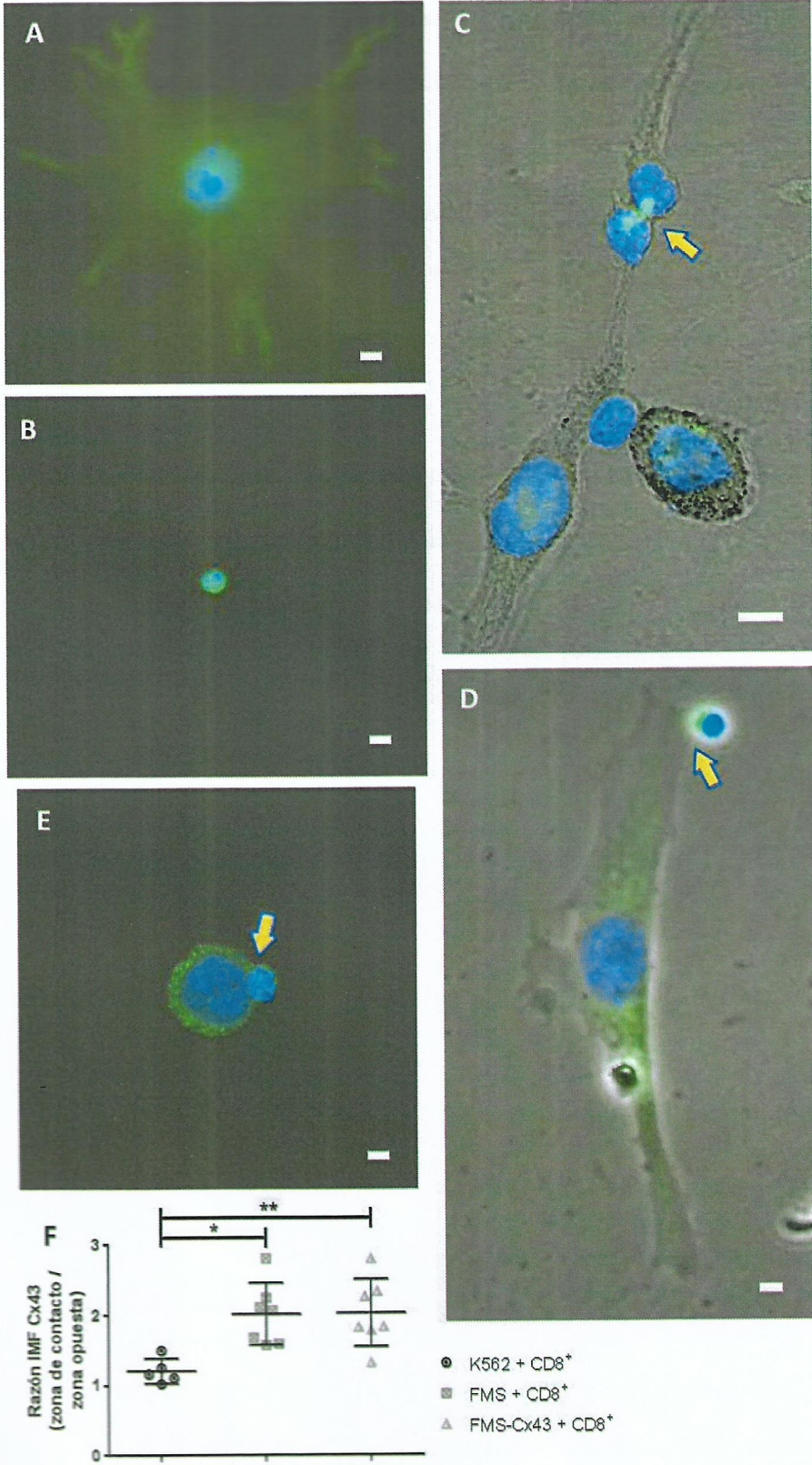
### **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPad PRISM versión 5.01. Las diferencias entre los tratamientos fueron evaluadas mediante ANOVA (intervalo de confianza de 95% y p<0,05) y los resultados fueron representados por valores promedios ± desviaciones estándar.

## Resultados

**Conexina 43 se polariza en la zona de la sinapsis inmunológica entre Linfocitos T citotóxicos y células tumorales.**

Los LT CD8<sup>+</sup> se especializan en eliminar células tumorales (Gajewski y col., 2013); para que esto suceda es importante el reconocimiento y destrucción de la célula tumoral a través de la formación de una sinapsis inmunológica (Abbas y col., 2008). Para determinar si los LT CD8<sup>+</sup> y las células tumorales se comunican mediante canales Gap Junctions-Cx43, realizamos co-cultivos de LT CD8<sup>+</sup>, que reconocen el antígeno MART-1 (presente en células de melanoma) con la línea de melanoma FMS o FMS-Cx43 (línea que sobreexpresa Cx43), y analizamos la localización de Cx43 mediante técnicas de inmunofluorescencia y microscopía. Observamos que en estado estacionario, tanto las células de melanoma como los LT expresan Cx43 de forma homogénea, tanto en la membrana nuclear como en la membrana plasmática (Figura 1 A y B). Luego de 30 minutos de co-cultivo, se distinguen varios conjugados celulares (LT CD8<sup>+</sup>:célula tumoral), y observamos que Cx43 se polariza hacia la célula contigua concentrándose principalmente en la zona de contacto celular o sinapsis inmunológica tanto con la línea FMS (figura 1 C) como en la línea FMS-Cx43 (figura 1 D). Para determinar si la polarización de Cx43 es antígeno dependiente, realizamos co-cultivos de LT CD8<sup>+</sup> anti-MART-1 con la línea tumoral K562, que no expresa MART-1, y analizamos la distribución de Cx43, confirmando que no hay polarización de Cx43 hacia la zona de contacto (figura 1 E). Estos resultados se cuantificaron, confirmando los resultados descritos (figura 1 F).



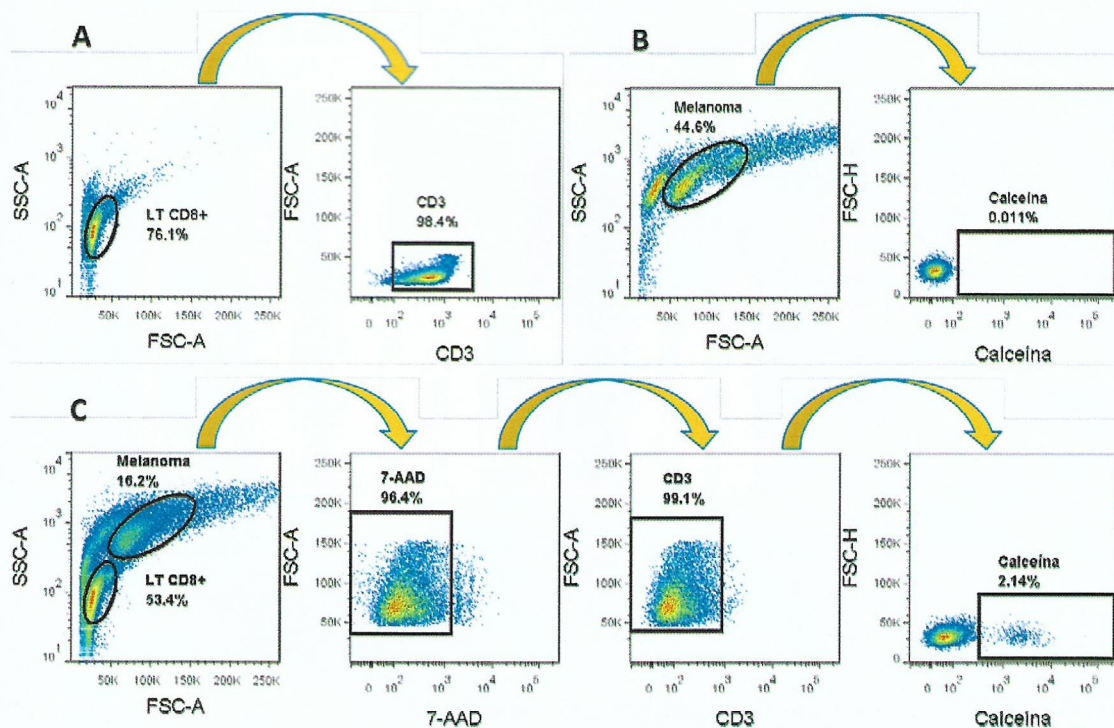
**Figura 1. Distribución de Cx43 en la sinapsis inmunológica.** Imágenes de microscopía de epifluorescencia que muestran la localización de Cx43 en A) células de melanoma FMS, y B) Linfocitos T CD8<sup>+</sup>. C) Co-cultivos de células FMS y LT CD8<sup>+</sup> anti-MART-1 por 30 minutos a una razón de 1:10, y D) Co-cultivos de células FMS-Cx43 y LT CD8<sup>+</sup> anti-MART-1 por 30 minutos a una razón de 1:10. E) Co- cultivo de células K562 con LT CD8<sup>+</sup> anti-MART-1 por 30 minutos a una razón de 1:10. En verde se observa Cx43 y en azul los núcleos. La flecha amarilla indica la zona de contacto entre el LT CD8<sup>+</sup> y la célula tumoral. La barra de la escala corresponde a 10  $\mu$ m. F) gráfico de dispersión que muestra la razón de la IMF de Cx43 en la zona de contacto celular versus el lado opuesto del linfocito en co-cultivos de células tumorales (FMS, FMS-Cx43 o K562) con LT CD8<sup>+</sup> anti-MART-1.  $p < 0,05$ .

### **Formación de Gap Junctions-Cx43 funcionales en la zona de la sinapsis inmunológica entre LT CD8<sup>+</sup> citotóxicos y células tumorales.**

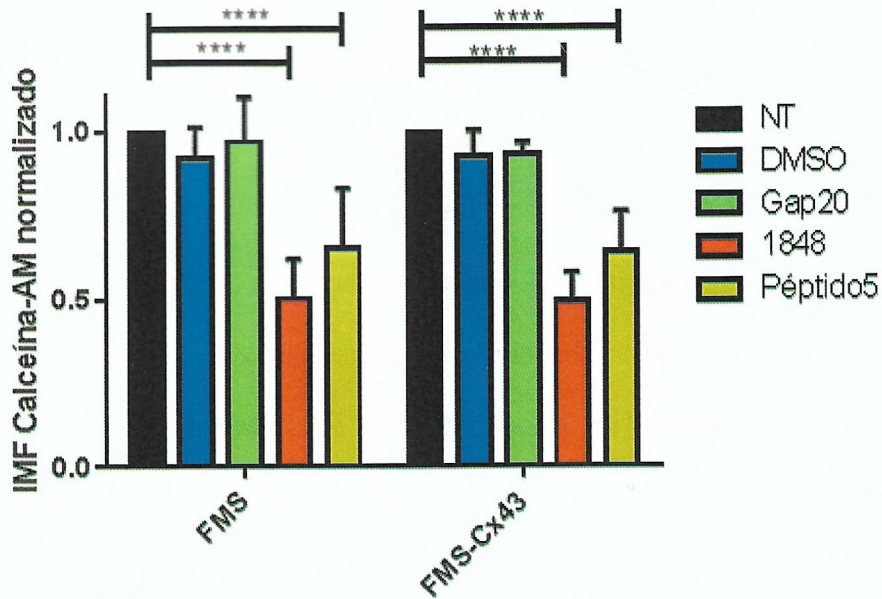
Para comprobar la formación de Gap Junctions-Cx43 funcionales entre LT CD8<sup>+</sup> y las líneas de melanoma FMS y FMS-Cx43, realizamos experimentos con el cell tracker Calceína-AM, que una vez que ingresa a la célula es procesado y sólo puede difundir de una célula a otra a través de estos canales GJ. De este modo, los LT CD8<sup>+</sup> fueron cargados con el cell tracker Calceína y luego co-cultivados con células de melanoma en una razón de 3:1 por 10 minutos, siendo posible identificar la población de células de melanoma que adquiere este marcador desde los LT CD8<sup>+</sup> a través de la formación de GJ funcionales. La estrategia de análisis, consistió en identificar la población de células de melanoma por tamaño y granulosidad, descartar las células muertas con 7-AAD, que no expresen CD3, es decir que no sean linfocitos, y que sean Calceína<sup>+</sup> (Figura 2 C).

Nuestros resultados muestran que los LT CD8<sup>+</sup> anti-MART-1 forman GJ funcionales con ambas líneas tumorales pues observamos traspaso de Calceína en ambos co-cultivos. Para confirmar la vía de entrada de este cell tracker, utilizamos un péptido inhibidor de GJs (1848), otro de hemicanales (Péptido5), y otro control (Gap20). Como se observa en la figura 3, el traspaso de Calceína fue parcialmente inhibido al bloquear los canales de Cx43 con el péptido mimético 1848 disminuyendo aproximadamente a la mitad para los co-cultivos con FMS y FMS-Cx43. Cuando se inhiben los hemicanales de Cx43 con el Péptido5, observamos una disminución parcial de la transferencia sólo en los co-cultivos con FMS-Cx43, la cual es menor a lo observado cuando se bloquean las GJ-Cx43.





**Figura 2. Estrategia de análisis para ensayo de transferencia de Calceína.** Gráficos de densidad representativos para el análisis de la formación y funcionalidad de las Gap Junctions de Cx43 para los co-cultivos de LT CD8<sup>+</sup> anti-MART-1 con las líneas de melanoma FMS o FMS-Cx43 en una razón de 3:1. Los linfocitos fueron previamente marcados con anti-CD3 PE-Cy7 y cargados con Calceína. En A) cultivo puro de LT CD8<sup>+</sup> anti-MART-1 marcados con CD3, en B) cultivo puro de melanoma y en C) co-cultivo de LT CD8<sup>+</sup> anti-MART-1 con melanoma donde se seleccionaron las células de melanoma por tamaño y granulosidad, vivas (7-AAD<sup>-</sup>), que no sean linfocitos (CD3<sup>-</sup>) y Calceína<sup>+</sup>.

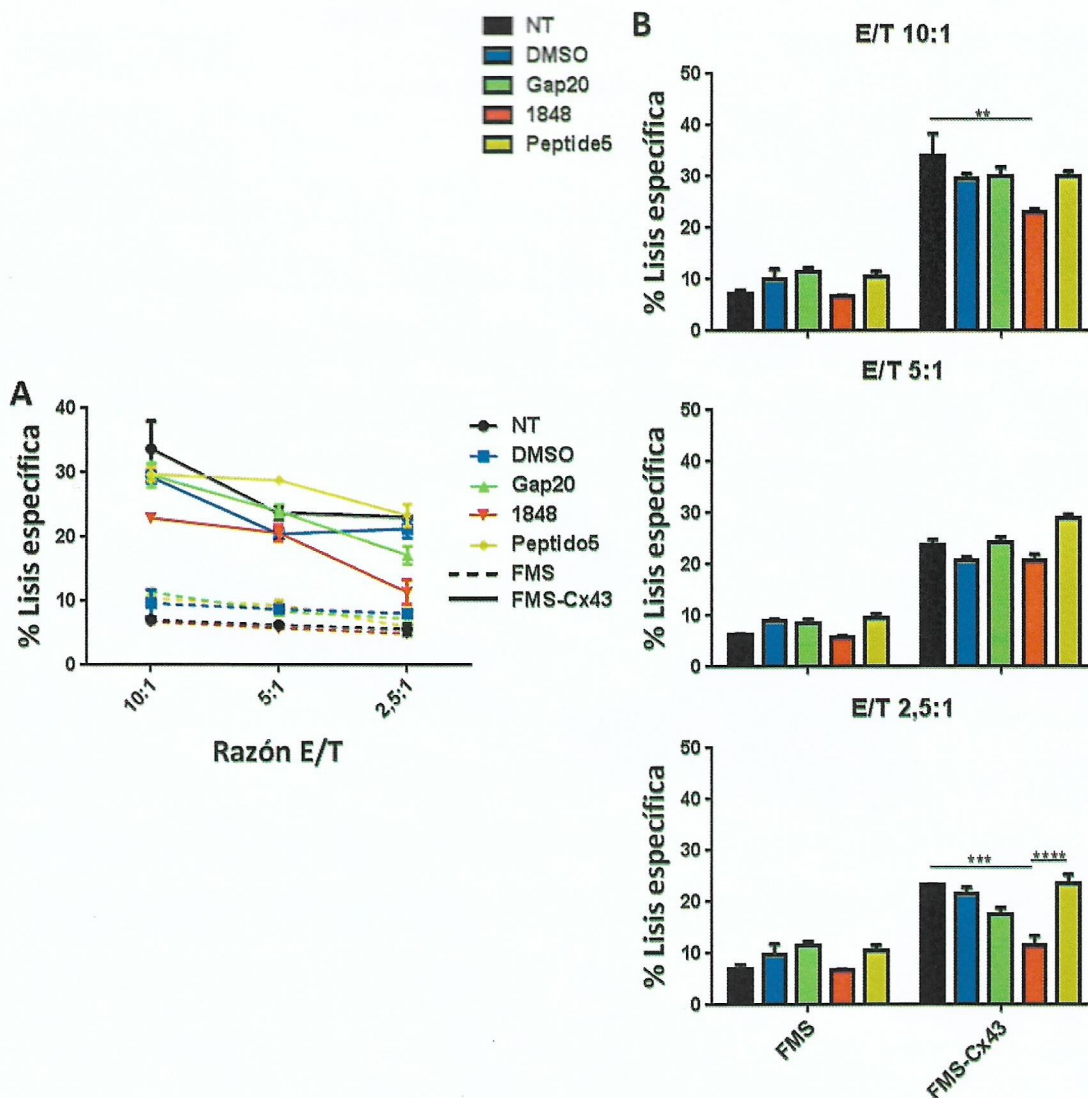


**Figura 3. Formación de Gap Junctions funcionales entre linfocitos T CD8<sup>+</sup> y células de melanoma.** Se realizaron co-cultivos de LT CD8<sup>+</sup> anti-MART-1 con células de melanoma (FMS o FMS-Cx43) por 10 minutos a una razón de 3:1. Los linfocitos fueron previamente marcados con anti-CD3 PE-Cy7 y cargados con Calceína. Las condiciones experimentales fueron: no tratado (NT), DMSO, Gap20, 1848 y Péptido5. El grafico de barras muestra la IMF de Calceína normalizada a la condición sin tratamiento en las células de melanoma.  $p < 0,05$ . N=3.

### **Las comunicaciones intercelulares mediadas por Cx43 contribuyen a la actividad citotóxica de LT CD8<sup>+</sup> contra células tumorales.**

Como se ha mencionado anteriormente, la eliminación de células tumorales por los LT CD8<sup>+</sup> depende de la formación de una sinapsis inmunológica (Abbas y col., 2008). Un aspecto inexplorado hasta el momento está referido a la participación de las GJs-Cx43 en este proceso. Para esto, realizamos ensayos que miden la capacidad lítica de los LT CD8<sup>+</sup> contra células blanco marcadas con el radioisótopo [<sup>51</sup>Cr]. El experimento consiste en medir la liberación de [<sup>51</sup>Cr] desde las células de melanoma FMS o FMS-Cx43 que sufren apoptosis posterior al reconocimiento de los LT CD8<sup>+</sup>. Para descartar la apoptosis basal de las líneas celulares, se realizó un cultivo con las células de melanoma sin LT CD8<sup>+</sup> y para obtener el porcentaje de lisis total, se mide el [<sup>51</sup>Cr] en el sobrenadante y dentro de las células target o diana.

Como se observa en la figura 4 A, se realizaron distintas razones de células efectoras con células blanco, confirmando una correlación positiva entre el número de LT versus la lisis específica. La línea de melanoma FMS-Cx43 que expresa mayores niveles de Cx43 presenta una mayor lisis específica en comparación con su parental FMS (figura 4 A). Por otro lado, cuando inhibimos la formación de los canales GJ-Cx43 con el péptido específico 1848 en los co-cultivos de LT CD8<sup>+</sup> con la línea FMS-Cx43, la citotoxicidad de los LT CD8<sup>+</sup> contra las células de melanoma disminuye significativamente (figura 4 B). Este fenómeno se observa a las razones de co-cultivo E:T de 10:1 y 2,5:1.



**Figura 4. Canales GJs formadas de Cx43 contribuyen a la citotoxicidad de los LT CD8<sup>+</sup> contra células tumorales.** La citotoxicidad fue medida mediante ensayos de liberación de [<sup>51</sup>Cr], donde células de melanoma (FMS o FMS-Cx43) fueron cargadas con [<sup>51</sup>Cr] y co-cultivadas con diferentes razones de LT CD8<sup>+</sup>. Las condiciones experimentales fueron: no tratado (NT), DMSO, Gap20, 1848 y Péptido5. Los resultados son presentados en porcentaje de lisis específica y son representativos de 3 ensayos para

la línea FMS y 4 ensayos para la línea FMS-Cx43. A) Gráfico de dispersión del ensayo y B) gráficos de barra para cada razón con su significancia estadística.  $p < 0,05$ .

## Discusión

En la inmunidad innata y adaptativa existen procesos dependientes del contacto físico célula-célula que son críticos para una eficiente respuesta contra células infectadas o neoplásicas. Estos procesos involucran desde la presentación antigénica en la activación de los LT hasta la respuesta efectora que estos realizan al encontrarse con su célula diana. (Trautmann & Valitutti 2003). En la estructura conocida como sinapsis inmunológica, participan moléculas de MHC, importantes para la presentación antigénica, moléculas de co-estimulación, importantes para una activación eficiente de los linfocitos, y los TCR necesarios para el reconocimiento antigénico y posterior función efectora (Abbas y col., 2008). Recientemente se ha comprobado que dentro de estas estructuras moleculares residen otras proteínas, las cuales también son importantes para lograr una eficiente respuesta inmunológica. Una de estas proteínas son las conexinas, proteínas de transmembrana capaces de formar hemicanales en la membrana de la célula, que al acoplarse con otro hemicanal de una célula adyacente forma un canal Gap Junction, los cuales participan en importantes procesos fisiológicos dentro del sistema inmune (Oviedo-Orta & Evans 2004). De esta forma, los canales GJ-Cx43 representan una forma de comunicación entre células del sistema inmune (Tittarelli y col., 2014).

Nuestros resultados demuestran que durante la sinapsis inmunológica entre un LT CD8<sup>+</sup> y una célula de melanoma, Cx43 se polariza hacia la zona de contacto celular. Además comprobamos que esta relocalización es antígeno dependiente confirmando los resultados expuestos en el trabajo de Mendoza-Naranjo y col. 2011 donde se describe que Cx43 se polariza al sitio de contacto celular, proceso dependiente del citoesqueleto de actina. Adicionalmente, nuestros resultados también concuerdan con los experimentos de

Salameh y col. (2010), donde se muestra, mediante técnicas de inmunofluorescencia, una orientación y polarización de Cx43 hacia las zonas de contacto celular en cardiomiocitos el cual representa, junto con las células neuronales (Robertson 1953) el modelo clásico para el estudio de las GJs.

Por otro lado, confirmamos la formación de GJ funcionales pues vemos que hay traspaso del cell tracker Calceína desde el LT a la célula tumoral, y que la inhibición específica de estos canales disminuye la transferencia del cell tracker. Debido a que las conexinas pueden formar tanto hemicanales como GJ (Goodenough y col., 1996) se utilizaron dos péptidos en los experimentos; uno que inhibe GJ y otro hemicanales. De hecho, cuando se bloquearon los hemicanales se observó una leve disminución del traspaso de Calceína lo que indica una salida de información desde el LT CD8<sup>+</sup> hacia al medio extracelular. No obstante, esta disminución es bastante menor a lo observado cuando se inhiben la formación de las GJ-Cx43, sugiriendo que la principal vía de transferencia de información es mediante la formación de canales intercelulares tipo GJ-Cx43 entre ambas células. Cuando comparamos la transferencia de Calceína para ambas líneas celulares, FMS y FMS-Cx43, no se observaron diferencias en el porcentaje de células positivas para este cell tracker (resultados no mostrados), es decir, en la cantidad de células que adquirieron Calceína desde los LT. Este efecto puede deberse a que el reconocimiento de la célula tumoral es independiente del bloqueo de las GJ por medio del péptido inhibidor siendo así estadísticamente igual la posibilidad de conjugados que se formen entre los LT con ambas líneas tumorales viéndose afectada solamente el traspaso del cell tracker en su cantidad neta por célula pero no en el número de células receptoras.

El desarrollo de una **respuesta inmune** antitumoral, depende en parte de una correcta activación y/o funcionalidad de los LT CD8<sup>+</sup> (o CTL) (Abbas y col., 2008), por lo que es particularmente importante evaluar el papel de los canales GJ-Cx43 sobre la citotoxicidad de estas células. Se han descrito varios métodos para medir la funcionalidad de los CTL, sin embargo el gold standard sigue siendo la detección de la liberación de [<sup>51</sup>Cr] de las células blanco. Los ensayos de citotoxicidad demostraron que a las 4 horas de co-cultivos entre LT CD8<sup>+</sup> con células de melanoma, la citotoxicidad fue de entre el 20 a 40% para la línea FMS-Cx43, lo que disminuyó significativamente cuando se utilizó el péptido inhibidor de GJs, mientras que para la línea FMS fue inferior al 15%. Esta inhibición sobre la citotoxicidad de los CTL puede deberse en parte, a la inhibición de la actividad de Perforinas y Granzimas, las cuales son liberadas por el LT posterior al reconocimiento de la célula target, lo cual fue demostrado en el trabajo de Neijssen y col., 2005, y confirmado en el trabajo de Tittarelli y col., 2014, donde evidenciaron que la actividad de la granzima B disminuye cuando se bloquean los canales GJ-Cx43. Estos resultados son concordantes a los obtenidos previamente por nuestro laboratorio, donde se demostró que el bloqueo de los canales GJ en células NK disminuye drásticamente la citotoxicidad de estas células, y también los flujos de Ca<sup>+2</sup> en la célula target (Tittarelli y col., 2014). Por último, existe una correlación positiva entre el porcentaje de lisis específica y el número de LT, cuando se mantiene fijo el número de células target. Este resultado concuerda con distintas publicaciones, fortaleciendo nuestros resultados (Monaco y col., 2011; Prajeeth y col., 2011).

Nuestros datos demuestran que Cx43 es importante para la función efectora de los LT CD8<sup>+</sup> contra las células de melanoma, pues la lisis específica contra las células tumorales



se ve afectada cuando las GJ-Cx43 son **bloqueadas**. Suponemos que la baja expresión de Cx43 en las células de melanoma **podría ser mecanismo** de evasión de las células cancerígenas, puesto que se conoce que **varios tipos** de tumor, incluyendo cáncer de colon (Lee y col., 2012) y de mamas (McLachlan y col., 2006), disminuyen la expresión de Cx43 durante la transición epitelio-mesenquimal, y que cuando se sobre-expresa Cx43 en las células de melanoma, éstas son más sensibles al reconocimiento de los LT CD8<sup>+</sup>, sugiriendo una relación entre la baja expresión de Cx43 y el aumento en la resistencia antitumoral.

A pesar de los resultados obtenidos aún quedan muchos aspectos por ser investigados en relación a los canales GJ-Cx43 en la inmunología antitumoral. Con respecto a este trabajo falta investigar el mecanismo por el cual las GJ-Cx43 se encuentran involucradas en la citotoxicidad de los LT CD8<sup>+</sup> contra las células de melanoma, y para esto proponemos evaluar la dinámica de los flujos de Ca<sup>+2</sup> en la célula tumoral, y la actividad de granzima en los LT CD8<sup>+</sup>.

En resumen, nuestros resultados muestran que las Gap Junction formadas por Conexina 43 son importantes en la función efectora de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> contra células de melanoma humano, lo cual contribuye a un mejor entendimiento de la respuesta antitumoral dando base a nuevos estudios que podrían conducir al diseño o mejoramiento de alguna inmunoterapia.

## Conclusiones

En este trabajo, observamos que Cx43 se polariza a la zona de contacto celular en la sinapsis inmunológica entre LT CD8<sup>+</sup> y células tumorales de melanoma, fenómeno observado en imágenes de inmunofluorescencia.

Además, evidenciamos que Cx43 es capaz de formar GJ funcionales que son capaces de permitir un traspaso de información desde el LT hacia la célula tumoral, lo que se demostró mediante los ensayos de funcionalidad con el cell tracker Calceína.

También, demostramos el rol que cumple la Cx43 en la capacidad citotóxica de los LT CD8<sup>+</sup> en la respuesta antitumoral, observándose una disminución en la lisis específica de las células de melanoma cuando se bloquea la formación de GJ-Cx43, además de evidenciarse una mayor lisis específica en la línea de melanoma que presenta mayor expresión de Cx43.

Considerando los resultados obtenidos en este trabajo, confirmamos que las GJ-Cx43 participan en la función efectora de los LT CD8<sup>+</sup> en el desarrollo de una respuesta antitumoral, comprobando lo que planteamos inicialmente en nuestra hipótesis. Sin embargo, aún falta dilucidar el mecanismo en el cual se encuentran involucradas estas conexiones intercelulares dentro de esta respuesta antitumoral.

## Referencias

- Aarntzen, E. H., Srinivas, M., Radu, C. G., Punt, C. J., Boerman, O. C., Figdor, C. G., ... & de Vries, I. J. M. (2013). In vivo imaging of therapy-induced anti-cancer immune responses in humans. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(13), 2237-2257.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2008). *Inmunología celular y molecular* 6a ed. Elsevier, Madrid.
- Abbasi, N. R., Shaw, H. M., Rigel, D. S., Friedman, R. J., McCarthy, W. H., Osman, I., ... & Polsky, D. (2004). Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. *Jama*, 292(22), 2771-2776.
- Aguilera, R., Araya, P., González, F., López, M., Muñoz, L., Pereda, C., Plaza, C., Reyes, D., Salazar, F., Stamm, T., Tittarelli, A. (2013). *Cáncer en Chile y en el mundo*. En F. Salazar, D. Reyes, E. Rivas (eds.), *Cáncer y prevención*. pp 24-26. Exhi, Santiago.
- American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2015*. Atlanta: American Cancer Society; 2015
- Balch, C. M., Gershenwald, J. E., Soong, S. J., Thompson, J. F., Atkins, M. B., Byrd, D. R., ... & Sondak, V. K. (2009). Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of Clinical Oncology*, 27(36), 6199-6206.
- Banchereau, J., & Palucka, A. K. (2005). Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nature Reviews Immunology*, 5(4), 296-306.
- Callahan, M. K., Postow, M. A., & Wolchok, J. D. (2014). CTLA-4 and PD-1 pathway blockade: combinations in the clinic. *Frontiers in oncology*, 4.
- Economopoulou, P., Mountzios, G., Pavlidis, N., & Pentheroudakis, G. (2015). Cancer of Unknown Primary Origin in the Genomic Era: Elucidating the dark box of cancer. *Cancer Treatment Reviews*.
- Evans, M. S., Madhunapantula, S. V., Robertson, G. P., & Drabick, J. J. (2013). *Current and future trials of targeted therapies in cutaneous melanoma*. In *Impact of Genetic Targets on Cancer Therapy* (pp. 223-255). Springer New York.

- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-E386.
- Gajewski, T. F., Schreiber, H., & Fu, Y. X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature immunology*, 14(10), 1014-1022.
- Goodenough, D. A., Goliger, J. A., & Paul, D. L. (1996). Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annual review of biochemistry*, 65(1), 475-502.
- Haque, T., Rahman, K. M., Thurston, D. E., Hadgraft, J., & Lane, M. E. (2015). Topical therapies for skin cancer and actinic keratosis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*.
- Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). The roles of IFN $\gamma$  in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine & growth factor reviews*, 13(2), 95-109.
- Jerant, A. F., Johnson, J. T., Sheridan, C., & Caffrey, T. J. (2000). Early detection and treatment of skin cancer. *American family physician*, 62(2), 357-386.
- Lampe, P. D., & Lau, A. F. (2000). Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Archives of biochemistry and biophysics*, 384(2), 205-215.
- Lee, C. C., Chen, W. S., Chen, C. C., Chen, L. L., Lin, Y. S., Fan, C. S., & Huang, T. S. (2012). TCF12 protein functions as transcriptional repressor of E-cadherin, and its overexpression is correlated with metastasis of colorectal cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 287(4), 2798-2809.
- Macintyre, A. N., & Rathmell, J. C. (2013). Activated lymphocytes as a metabolic model for carcinogenesis. *Cancer Metab*, 1(5).
- Mandarà, M., Nortilli, R., Sava, T., & Cetto, G. L. (2006). Chemotherapy for metastatic melanoma.
- McLachlan, E., Shao, Q., Wang, H. L., Langlois, S., & Laird, D. W. (2006). Connexins act as tumor suppressors in three-dimensional mammary cell organoids by regulating **differentiation and angiogenesis**. *Cancer research*, 66(20), 9886-9894.

- Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*, 296(5566), 298-300.
- Mendoza-Naranjo, A., Bouma, G., Pereda, C., Ramírez, M., Webb, K. F., Tittarelli, A., ... & 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.
- Mendoza-Naranjo, A., Saéz, P. J., Johansson, C. C., Ramírez, M., Mandaković, D., Pereda, C., ... & 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.
- Meşe, G., Richard, G., & White, T. W. (2007). Gap junctions: basic structure and function. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(11), 2516-2524.
- Monaco, E. L., Tremante, E., Cerboni, C., Melucci, E., Sibilio, L., Zingoni, A., ... & Giacomini, P. (2011). Human leukocyte antigen E contributes to protect tumor cells from lysis by natural killer cells. *Neoplasia*, 13(9), 822-IN14.
- Motley, R., Kersey, P., & Lawrence, C. (2002). Multiprofessional guidelines for the management of the patient with primary cutaneous squamous cell carcinoma. *British Journal of Dermatology*, 146(1), 18-25.
- Neijssen, J., Herberts, C., Drijfhout, J. W., Reits, E., Janssen, L., & Neefjes, J. (2005). Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature*, 434(7029), 83-88.
- Neijssen, J., Pang, B., & Neefjes, J. (2007). Gap junction-mediated intercellular communication in the immune system. *Progress in biophysics and molecular biology*, 94(1), 207-218.
- Nguyen, T. D., & Taffet, S. M. (2009). A model system to study Connexin 43 in the immune system. *Molecular immunology*, 46(15), 2938-2946.
- Nicholson, B. J. (2003). Gap junctions—from cell to molecule. *Journal of cell science*, 116(22), 4479-4481.

- Oviedo-Orta, E., & Evans, W. H. (2004). Gap junctions and connexin-mediated communication in the immune system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1662(1), 102-112.
- Oviedo-Orta, E., Gasque, P., & Evans, W. H. (2001). Immunoglobulin and cytokine expression in mixed lymphocyte cultures is reduced by disruption of gap junction intercellular communication. *The FASEB Journal*, 15(3), 768-774.
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, 357(9270), 1777-1789.
- Parmiani, G., Castelli, C., Rivoltini, L., Casati, C., Tully, G. A., Novellino, L., ... & Santinami, M. (2003, December). Immunotherapy of melanoma. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 13, No. 6, pp. 391-400). Academic Press.
- Prajeeth, C. K., Haeberlein, S., Sebald, H., Schleicher, U., & Bogdan, C. (2011). Leishmania-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines but not of NK cell cytotoxicity. *Infection and immunity*, 79(7), 2699-2708.
- Robertson, J. D. (1953). Ultrastructure of two invertebrate synapses. *Experimental Biology and Medicine*, 82(2), 219-223.
- Salameh, A., Wustmann, A., Karl, S., Blanke, K., Apel, D., Rojas-Gomez, D., ... & Dhein, S. (2010). Cyclic mechanical stretch induces cardiomyocyte orientation and polarization of the gap junction protein connexin43. *Circulation research*, 106(10), 1592-1602.
- Salazar-Onfray, F. 2013. Gap Junctions and Connexins in the Immune Defense Against Tumors. En E. Oviedo-Orta, B. R. Kwak & W. H. Evans (eds.), *Connexin Cell Communication Channels*. Pp 99-110. CRC Press.
- Schwartz, A. R. (2011). Melanoma maligno y diagnóstico diferencial de lesiones pigmentadas en piel. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 22(6), 728-734.
- Shanker, A., Verdeil, G., Buferne, M., Inderberg-Suso, E. M., Puthier, D., Joly, F., ... & Schmitt-Verhulst, A. M. (2007). CD8 T cell help for innate antitumor immunity. *The Journal of Immunology*, 179(10), 6651-6662.
- Storey, M., & Jordan, S. (2008). An overview of the immune system. *Nursing Standard*, 23(15), 47-56.

- Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719-724.
- Tittarelli, A., Guerrero, I., Tempio, F., Gleisner, M. A., Avalos, I., Sabanegh, S., ... & Salazar-Onfray, F. (2015). Overexpression of connexin 43 reduces melanoma proliferative and metastatic capacity. *British Journal of Cancer*.
- Tittarelli, A., Mendoza-Naranjo, A., Fariás, M., Guerrero, I., Ihara, F., Wennerberg, E., ... & 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.
- Trautmann, A., & Valitutti, S. (2003). The diversity of immunological synapses. *Current opinion in immunology*, 15(3), 249-254.
- Voskoboinik, I., Whisstock, J. C., & Trapani, J. A. (2015). Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nature Reviews Immunology*.
- Yang, X., Zhang, X., Fu, M. L., Weichselbaum, R. R., Gajewski, T. F., Guo, Y., & Fu, Y. X. (2014). Targeting the tumor microenvironment with interferon- $\beta$  bridges innate and adaptive immune responses. *Cancer cell*, 25(1), 37-48.
- Zahler, S., Hoffmann, A., Gloe, T., & Pohl, U. (2003). Gap-junctional coupling between neutrophils and endothelial cells: a novel modulator of transendothelial migration. *Journal of leukocyte biology*, 73(1), 118-126.
- Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., André, F., Tesniere, A., & Kroemer, G. (2008). The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success?. *The Journal of clinical investigation*, 118(6), 1991.