Universidad ORT Uruguay
Facultad de Ingeniería

Contribución a la validación experimental del poro putativo de Tmem176b como potencial blanco farmacológico para tratamiento oncológico

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Joaquín Trias – 247508

Tutor: Marcelo Hill

2024

Declaración de autoría

Yo, Joaquín Trias, declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano.

Puedo asegurar que:

● La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba una pasantía en el Laboratorio de Inmunorregulación e Inflamación del Institut Pasteur de Montevideo.

● Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad.

● Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía.

● En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas.

● Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí.

● Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Joaquin Trias 02/05/2024

Agradecimientos

A Marcelo, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por su orientación y disposición a lo largo de este año.

A la gente del LIRI, gracias a todos por su ayuda, paciencia, disposición y enseñanzas conmigo, aprendí muchas cosas gracias a ustedes.

A los que no abandonan, por todos estos años de carrera bancando.

A mis amigos de Crossfit, gracias por integrarme y las risas de todos los días.

A Afrika, por ser un antes y después.

En especial a mi madre, gracias por siempre apoyarme y acompañarme, no hubiese logrado nada de esto si no fuera por vos, te admiro por todo tu sacrificio.

Resumen

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. Mecanismos mediados por el sistema inmune pueden llevar al reconocimiento específico y muerte de células malignas. Sin embargo, los tumores evitan su destrucción por el sistema inmune al inducir un microambiente inmunorregulador que favorece la emergencia de variantes celulares malignas resistentes al control inmunológico. El estudio de moléculas reguladoras del sistema inmune puede abrir la puerta a nuevas inmunoterapias contra el cáncer.

Siguiendo esta línea de investigación, Tmem176b (también conocido como TOlerance Related and InduceD; TORID) surge como un canal iónico capaz de modular la respuesta inmune antitumoral a través de su inhibición sobre el inflamasoma NLRP3 mediante mecanismos iónicos. En otras palabras, TORID promueve el desarrollo tumoral a través de la disminución de mecanismos efectores de la inmunidad. Esto abre como perspectiva la utilización de inhibidores de TORID como una nueva inmunoterapia antitumoral.

Nuestro grupo ha caracterizado al compuesto BayK8644 como un inhibidor farmacológico de Tmem176b. Demostrando que el tratamiento con esta pequeña molécula logró mejorar la sobrevida de ratones con cáncer de manera dependiente del inflamasoma, así como aumentar significativamente la eficacia de los bloqueadores de puntos de control (anti-CTLA-4 y anti-PD-1). Desde una perspectiva biotecnológica, desarrollar nuevas generaciones de inhibidores de Tmem176b constituye un objetivo estratégico para valorizar este conocimiento. Para cumplir ese ambicioso objetivo, nuestro grupo aspira a avanzar hacia el desarrollo racional de nuevos compuestos, basados en conocimiento estructural de Tmem176b. Esta estrategia implica el estudio de la interacción física entre Tmem176b y BayK8644 a través de la técnica de “photoaffinity labelling”, buscando determinar a qué sitio de Tmem176b se une el ligando BayK8644. Sin embargo, para poder interpretar la información que surja de ese experimento, debemos determinar cómo está conformado el poro por el cual transitan los iones a través de la proteína.

Colaboramos con el biólogo estructural Dr. Felipe Trajtenberg para realizar un modelado y análisis computacional de TORID a través del algoritmo “Alphafold”. Se identificó un poro putativo que requiere validación experimental. Creemos que los residuos aminoacídicos que forman este supuesto poro podrían ser blanco de la molécula inhibidora BayK8644. Esto podría significar que, al conocer más acerca de este poro, podrían emerger nuevas generaciones de fármacos derivados de BayK8644, a partir de estrategias de diseño racional de drogas, que tengan como dianas a los aminoácidos críticos que componen el poro de TORID.

El objetivo principal de este trabajo fue contribuir a validar experimentalmente el poro putativo identificado. Dado que una de las perspectivas de este trabajo a corto plazo es evaluar nuevos inhibidores de Tmem176b in vivo, comenzamos también a poner a punto un modelo murino de cáncer de colon con el que se evaluaran nuevos inhibidores de Tmem176b.

En el marco de dicho razonamiento se decidió analizar un total de seis mutantes de residuos aminoacídicos. Se cree que estas mutaciones pueden influir en la modulación de la actividad del canal y podrían dejar en evidencia el rol del aminoácido que fue mutado para la actividad del canal iónico. Los aminoácidos estudiados fueron A128, K217, Q71, H116 y F210.

En lo que respecta al aminoácido A134, existe evidencia científica que afirma la existencia de un SNP el cual es codificante para dicha mutación y es asociado con una mayor sobrevida en pacientes con cáncer colorrectal.(1) Nuestros resultados indican que dicha mutación se trata de una “loss of function” la cual bloquea totalmente la actividad de TORID.

En cuanto a los demás residuos aminoacídicos, este trabajo demuestra que al igual que en A128, si se analiza una mutación en el residuo K217, sucede una inhibición total de la actividad del canal iónico. En lo que respecta a los residuos H116 y F210, no se encontró que exista una diferencia de actividad significativa a la hora del transporte iónico en TORID cuando se realizan alteraciones en estos aminoácidos, con

respecto a la proteina canal iónico en su estado nativo. Por su parte, al mutar al residuo Q71, se vio que existía una inhibición parcial de la actividad de la proteina.

En otra serie de experimentos, encontramos que la inyección subcutánea de 1,0e6 células MC38 (línea celular de cáncer colorrectal murino) deriva en una formación tumoral satisfactoria en ratones.

En conclusión, nuestros resultados muestran que existen residuos aminoacídicos claves en el canal iónico, que, al ser sustituidos o bloqueados, desencadenan en una modulación inhibitoria de la actividad de TORID. Esto abre como perspectiva la utilización de estos aminoácidos como potenciales blancos de fármacos inhibidores de TORID como nuevas terapias antitumorales. Estas terapias deberían evaluarse en modelos murinos optimizados.

Palabras clave

Cáncer

Inmunoterapia

Tmem176b

BayK8644

Fármacos

Inflamasoma

Mutantes

Citometría de flujo

Modelo murino

Colorrectal

Índice

Declaración de autoría 2
Agradecimientos 3
Resumen 4
Palabras clave 6
Índice de tablas 8
Índice de ilustraciones 9
1. Introducción 11
1.1. La relación cáncer-inmunología 11
1.2. Respuesta inmunológica ante el crecimiento tumoral 12
1.3. Inmunoterapias contra el cáncer 14
1.4. Inflamación promotora de tumores e inmunoedición 14
1.5. Inflamasomas 16
1.6. Tmem176b/Tmem176a 18
1.7. El compuesto BayK8644 20
2. Objetivos 23
3. Metodología 24
3.1. Líneas celulares 24
3.2. Ratones 24
3.3. Diseño de plásmidos 24
3.4. Alineamiento de la secuencia de Tmem176b en diferentes especies utilizando herramientas bioinformáticas 24
3.5. Transfección 25
3.6. Puesta a punto de un modelo terapéutico de cáncer en murinos 27
4. Resultados y Discusión 28
4.1. Estudio de alineamiento de secuencias de Tmem176b humano y murino 28
4.2. Estudio de actividad de mutantes de Tmem176b para la validación funcional del poro hipotético 28
4.3. Puesta a punto de un modelo terapéutico de cáncer en murinos 47
5. Conclusiones y Perspectivas 49
Referencias bibliográficas 50
Anexos 53

Índice de tablas

Tabla 1. Función de las células inmunes y su actividad anti y protumoral. 15

Índice de ilustraciones

Figura 1. Conceptualización gráfica de la inmunoedición. 12

Figura 2. Representación de mecanismos y moléculas que activan la formación del inflamasoma 17

Figura 3. Modelado de Tmem176b y Tmem176a 19

Figura 4. Modelaje tipo “AlphaFold” de Tmem176b.. 21

Figura 5. Modelaje del presunto poro del canal iónico y unión hipotética del compuesto BayK8644 a la proteína Tmem176b. 22

Figura 6. Esquema representativo de la disposición de las muestras en placa de 96 pocillos. 26

Figura 7. Alineamiento local de secuencias aminoacídicas de la proteina Tmem176b..... 28

Figura 8. Ensayo de actividad del mutante A128T.. 29

Figura 9. Estudio del porcentaje de células transfectadas con el fluorocromo mCherry de muestras correspondientes al mutante A128T. 31

Figura 10. Ensayo de actividad de los mutantes K217A y Q71A. 32

Figura 11. Primer replicado del estudio del porcentaje de células transfectadas con el fluorocromo mCherry de muestras correspondientes a los mutantes Q71A y K217A. 34

Figura 12. Segundo replicado del estudio del porcentaje de células transfectadas con el fluorocromo mCherry de muestras correspondientes a los mutantes Q71A y K217A.. 36

Figura 13. Tercer replicado del estudio del porcentaje de células transfectadas con el fluorocromo mCherry de muestras correspondientes a los mutantes Q71A y K217A.. 38

Figura 14. Ensayo de actividad de los mutantes H116A, F210A y F210W. 39

Figura 15. Primera réplica del estudio del porcentaje de células transfectadas con el fluorocromo mCherry de muestras correspondientes a los mutantes H116A, F210A y F210W. 41

Figura 16. Segunda réplica del estudio del porcentaje de células transfectadas con el fluorocromo mCherry de muestras correspondientes a los mutantes H116A, F210A y F210W. 43

Figura 17. Ensayo de actividad de los mutantes K217A, H116A, F210A y F210W... 44

Figura 18. Estudio del porcentaje de células transfectadas con el fluorocromo mCherry de muestras correspondientes a los mutantes K217A, H116A, F210A y F210W..... 46

Figura 19. Desarrollo tumoral en ratones..... 48

1. Introducción

1.1. La relación cáncer-inmunología

Hoy en día se sabe que existe un contacto estrecho entre el desarrollo del cáncer y el sistema inmunológico. La respuesta inmunológica tiene el potencial de eliminar de manera específica células malignas sin la necesidad de dañar las células/tejidos sanos del cuerpo además de crear una memoria inmunológica a largo plazo capaz de prevenir recurrencias.(2) El sistema inmunológico posee una cierta dualidad, por un lado, tiene la capacidad de detectar y eliminar células tumorales, y por el otro, puede proveer un microambiente favorable para el crecimiento tumoral.(3) La inflamación crónica en el microambiente tumoral y la capacidad del tumor para evadir la respuesta inmune son factores claves para la oncogénesis.(4) Sin embargo, el proceso inflamatorio también puede promover respuestas inmunes antitumorales.(5)

La capacidad que tiene el sistema inmunológico de controlar el crecimiento de neoplasias se ha discutido con controversia durante muchos años; en 1909, Paul Ehrlich describió la importante función del sistema inmune para proteger al hospedero contra el cáncer. A mediados del siglo XX, Burnet y Thomas postularon el concepto de la vigilancia inmunológica, tratando de demostrar qué hospederos con un sistema inmune deficiente son más susceptibles a desarrollar tumores malignos.

En la década del 1990, la disponibilidad de nuevos modelos murinos inmunodeprimidos permitió reafirmar la hipótesis de la inmunovigilancia, demostrando la importancia del interferón endógeno para proteger al hospedero del crecimiento tumoral.(6) Además, se describió el importante rol de la perforina (una proteína citolítica encontrada en linfocitos citotóxicos) en la inhibición de tumores; principalmente en el desarrollo de linfomas de células B.(7) Gracias a estos hallazgos se despertó el interés por el concepto de la vigilancia inmunológica con relación al cáncer. En los últimos años, se han logrado notables descubrimientos que confirmaron y refinaron esta hipótesis. El potencial que tiene el sistema inmunológico de inhibir el crecimiento de tumores malignos es el fundamento de la inmunoterapia oncológica. (3,8)

Con el pasar de los años, la hipótesis de inmunovigilancia ha ido evolucionando hacia un concepto más amplio y refinado conocido como inmunoedición. La inmunoedición del cáncer es un proceso dinámico que consta de tres fases: eliminación, equilibrio y escape (Figura 1). (3,9)

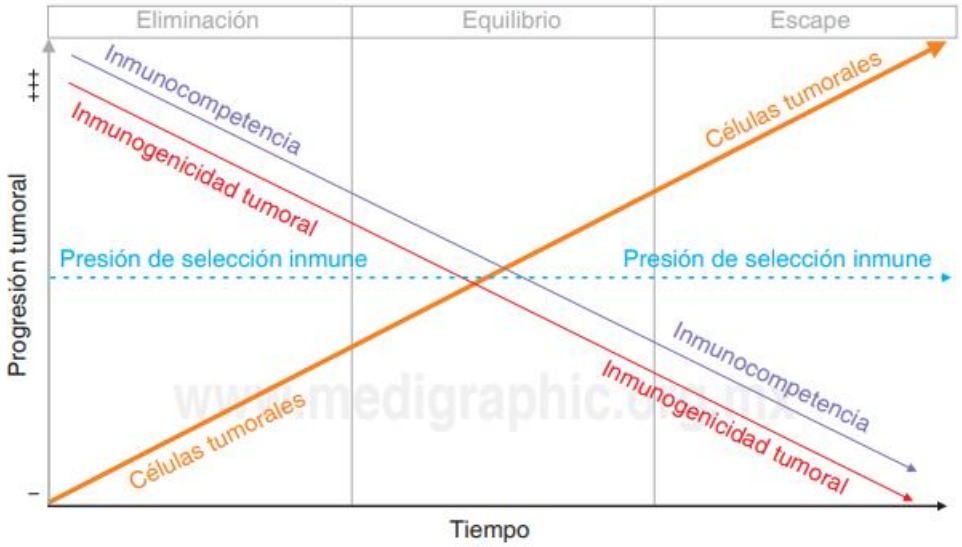


Figura 1. Conceptualización gráfica de la inmunoedición. Células tumorales con alta inmunogenicidad en un hospedero inmunocompetente probablemente serán eliminadas con éxito. Con el paso del tiempo, mediante la presión de selección inmune pueden surgir células tumorales con una menor inmunogenicidad, capaces de eludir la respuesta inmunológica del hospedero. Conforme el tumor progresa, sus células logran debilitar la respuesta antitumoral del sistema inmunológico. En la fase de escape, el equilibrio entre eliminación y aparición de nuevas células tumorales se inclina hacia la proliferación tumoral, con la consiguiente aparición clínica del cáncer. Tomado de Velázquez et al. (2017).(10)

La fase de eliminación corresponde a la visión contemporánea de la hipótesis original de la vigilancia inmunológica. En esta fase, el sistema inmune innato y adaptativo trabajan en conjunto para erradicar el crecimiento de tumores de forma exitosa. La infiltración de células del sistema inmunológico ha sido demostrada en la mayoría de los tumores sólidos. Nuestra comprensión actual de los mecanismos in vivo mediante los cuales el sistema inmune reconoce a las células tumorales y de las vías de activación del sistema inmune indiferenciado se basa en conocimiento experimental. Existen diversos mecanismos que pueden llevar a la eliminación temprana de tumores; señales de peligro liberadas por células transformadas o células tumorales pueden alertar y activar al sistema inmunológico, el daño al ADN puede inducir una transformación temprana en células vecinas, activando a ligandos inducidos por estrés que pueden ser reconocidos por receptores de activación de linfocitos. Ante la ausencia de estas señales de peligro, las células cancerígenas pueden pasar desapercibidas por el sistema inmune.(3)

Las células tumorales que han sobrevivido a la fase de eliminación entran en la fase de equilibrio. Esta etapa depende únicamente del sistema inmunológico adaptativo, a diferencia de la fase de eliminación y de escape, que dependen del sistema inmunológico innato y adaptativo. Mediante la presión de selección inmune se puede inducir la formación de células tumorales con una inmunogenicidad reducida, que tendrán una mayor capacidad de sobrevivir en un hospedero inmunocompetente. De este modo se explica la aparentemente paradójica formación de tumores en individuos con un sistema inmunológico intacto. Por medio de la presión de selección inmune, durante la fase de equilibrio ocurre la continua eliminación de células tumorales acompañada de una persistente aparición de variantes celulares resistentes.(3)

Las células tumorales entran en la fase de escape luego de haber fallado la mayoría de los mecanismos de supresión tumoral intrínsecos y extrínsecos. El escape de las células tumorales puede ocurrir a nivel de la misma célula y/o a nivel del microambiente tumoral. La reducción de la inmunogenicidad de dichas células, que puede ser causada por la pérdida de la proteína de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC de tipo 1), dificulta su reconocimiento por el sistema inmunológico.(3,11) Adicionalmente, las células tumorales pueden adquirir una resistencia contra funciones citotóxicas de células inmunes a través de la expresión de moléculas anti apoptóticas.(3,12) El escape puede darse también como consecuencia de una red compleja de inmunodepresión dentro del microambiente tumoral. Existen diversos factores producidos por células tumorales o inmunes que contribuyen a la formación de un microambiente inmunodeprimido como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento transformante (TGF), la interleucina 10, la prostaglandina E2, las fosfatidilserinas solubles, Fas soluble o indoleamina 2,3-dioxigenasa.(13) Además, las células tumorales pueden inducir el reclutamiento de células inmunes capaces de inhibir la respuesta antitumoral del hospedero como células T reguladoras o células supresoras de origen mieloide. (14)

1.2. Respuesta inmunológica ante el crecimiento tumoral

Estudios que analizan las interacciones entre el sistema inmunológico y el cáncer revelan que cada uno de los mecanismos del sistema inmune innato y adaptativo participan del reconocimiento y control tumoral. La respuesta inmunológica ante el crecimiento tumoral ocurre a través del reconocimiento de antígenos

tumorales. El sistema inmunológico puede identificar proteínas con mutaciones provenientes de oncogenes, proteínas virales en tumores que tienen su origen en una infección viral, como el cáncer de cuello uterino, o proteínas propias del individuo con una expresión anómala. (2,15)

No obstante, la progresión maligna de los tumores ocasiona una supresión inmune importante, interfiriendo con la capacidad del sistema inmunológico de montar una respuesta antitumoral efectiva. Hallazgos recientes evidencian que la supresión inmune se debe a la capacidad que tienen las neoplasias de alterar la respuesta inmunológica del cuerpo. El microambiente tumoral puede evitar la expansión de linfocitos T colaboradores y citotóxicos específicos para los antígenos tumorales al promover la producción de citoquinas y otros factores proinflamatorios. De este modo ocurre una acumulación de células supresoras, como los linfocitos T reguladores, que inhiben una respuesta del sistema inmune.(2)

Los avances académicos en el área oncológica han permitido desarrollar abordajes inmunoterapéuticos innovadores contra el cáncer. Actualmente, existen a nivel clínico métodos para estimular la inmunidad contra el crecimiento tumoral a través del bloqueo de vías o células inhibitorias en el microambiente tumoral. Este bloqueo se puede lograr, por ejemplo, con anticuerpos contra la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA 4), muerte programada-1 (PD-1) y su ligando (PD-L1), o quimioterapia a dosis bajas. Asimismo, se puede estimular la especificidad de la inmunidad antitumoral al inducir la expansión de células T y anticuerpos dirigidos a antígenos tumorales bien definidos, este estímulo se puede lograr con vacunas, adyuvantes potentes y citoquinas inmunoestimulantes. Como monoterapia estos abordajes ya tienen un impacto relevante en el tratamiento de pacientes con malignidades avanzadas, que en el pasado eran intratables. La inmunoterapia tiene el potencial de transformar el tratamiento del cáncer y de mejorar considerablemente el pronóstico de vida de los pacientes.(2)

Recientemente, se ha comenzado a estudiar el cáncer como una enfermedad sistémica, ampliando el enfoque de la célula tumoral al hospedero y el microambiente en el cual se desarrolla. El sistema inmunológico del hospedero es un componente crucial del microambiente en el que crece un tumor. Los tumores malignos tienen la capacidad de eludir la destrucción inmune, que consiste en una respuesta inflamatoria aguda con la finalidad de eliminar las células tumorales. Además, los tumores malignos tienen la capacidad de causar un estado inflamatorio crónico, que promueve el crecimiento tumoral y previene su eliminación.(16)

Las primeras células transformadas son reconocidas por células NK (NK por sus siglas en inglés "*Natural Killer*"), a través de ligandos específicos de las células tumorales; esto lleva al reconocimiento y a la destrucción de éstas. Los fragmentos de las células transformadas son fagocitados y procesados por macrófagos y células dendríticas, que a su vez son activadas para secretar citoquinas proinflamatorias y presentar las moléculas derivadas de las células tumorales a los linfocitos T y B. La activación de los linfocitos T y B lleva a la producción de citoquinas adicionales, que exacerba la activación del sistema inmune innato y promueven la producción de anticuerpos y células T específicas para el tumor en cuestión. La activación completa del sistema inmune adaptativo lleva a la eliminación de las células tumorales remanentes y a la generación de una memoria inmune específica contra los componentes del tumor para prevenir recurrencias.(2)

Los actores del sistema inmune adaptativo tales como células T CD4+ colaboradoras, células T CD8+ citotóxicas y anticuerpos pueden reconocer específicamente antígenos tumorales, que son proteínas celulares con una expresión anormal debido a mutaciones genéticas, diferencias cuantitativas de su expresión o diferencias por modificaciones postraduccionales. Como se comentó anteriormente, en tumores que tienen un origen viral, como el cáncer de cuello uterino causado por el virus del papiloma humano, las proteínas virales también pueden funcionar como antígenos tumorales y blancos de la respuesta inmunológica antitumoral.(15,17)

1.3. Inmunoterapias contra el cáncer

Los avances en la inmunología básica y biología tumoral que explican los mecanismos de interacción entre el sistema inmunológico y las células tumorales han permitido el desarrollo de diversas inmunoterapias contra el cáncer con resultados que han revolucionado la oncología clínica.(18)

La inmunidad y la respuesta antitumoral están influenciadas por el tipo de tumor, el hospedero y los factores ambientales. Estudios clínicos han demostrado que estos factores se pueden agrupar en perfiles inmunes que predicen la respuesta a la inmunoterapia.(19)

Los anticuerpos monoclonales son agentes inmunoterapéuticos bien establecidos que interaccionan con antígenos específicos expresados por células cancerígenas. El trastuzumab y el rituximab han mostrado su eficacia contra el cáncer de mama y el linfoma de células B respectivamente. Aunque su mecanismo antitumoral directo es responsable de remisiones transitorias, las tasas de curación que han logrado son bajas. El potencial de los anticuerpos monoclonales se ve limitado por su administración en un curso avanzado de la enfermedad, cuando el sistema inmunológico del hospedero ya se encuentra importantemente deprimido. (2,20)

La transferencia de células T puede generar un efecto más prolongado que los anticuerpos, sin embargo, mientras la respuesta de memoria se limite a una reducida cantidad de líneas clonales, las células tumorales con antígenos negativos podrán escapar. Los beneficios de las vacunas contra el cáncer se ven limitados por la presencia de numerosas células T reguladoras y de células supresoras de origen mieloide (MDSC) que ejercen una función inmunosupresora. De este modo, se evita la maduración de células presentadoras de antígenos y la activación de células T. La falla de algunas inmunoterapias se está atribuyendo a su incapacidad de activar el sistema inmunológico. (2,21)

Para el desarrollo de nuevas inmunoterapias se debería tratar de utilizar agentes dirigidos contra el cáncer de forma directa en combinación con agentes que ataquen el sistema inmune en el microambiente tumoral mediante citoquinas, supresores de células T reguladoras y MDSC, o a través de anticuerpos que modulen la actividad de las células T. (2)

El conocimiento actual de las interacciones entre el sistema inmunológico y el cáncer sugiere que la inmunoterapia adecuada, administrada en la fase apropiada de la progresión tumoral tiene el potencial de modificar la respuesta inmune en el microambiente tumoral de un efecto protumoral a un efecto antitumoral.(2)

1.4. Inflamación promotora de tumores e inmunoedición

Los procesos inflamatorios habitualmente tienen la función de mantener la homeostasis tisular en respuesta a estresores como infecciones o daño tisular; existe una estrecha relación entre la inflamación y la generación de tumores. En el siglo XIX, Rudolf Virchow fue el primero en postular la relación entre la inflamación y el cáncer al observar infiltración leucocitaria en tumores. La inflamación aguda usualmente lleva a respuestas inmunológicas adaptativas que suelen proteger contra patógenos o el cáncer, por otro lado, la inflamación crónica contribuye a la génesis tumoral en todas sus etapas: a la inducción mediante la generación de un estrés genotóxico, al crecimiento induciendo la proliferación celular y a la progresión promoviendo la angiogénesis e invasión tisular. Actualmente, se sabe que la inflamación crónica es responsable del microambiente favorable para la generación tumoral. Sin embargo, existe abundante evidencia del desarrollo de una inmunidad antitumoral que puede proteger al hospedero del desarrollo de tumores.(22,23)

La inmunoedición y la inflamación crónica promotora del crecimiento tumoral pueden coexistir en el microambiente tumoral. Algunas citoquinas tienen efectos oncogénicos y al mismo tiempo promueven la inmunidad antitumoral. Por ejemplo, el factor de crecimiento transformante (TGF) ejerce un efecto supresor sobre células tumorales o el microambiente local para inhibir el crecimiento tumoral en etapas premalignas. Una vez que el tumor logra vencer los efectos supresores, el mismo factor de crecimiento transformante contribuye a su progresión, invasión y metástasis. Muchas células del sistema inmune son potencialmente bifuncionales en relación con el crecimiento tumoral (Tabla 1).(24)

El resultado final de la inflamación asociada a tumores depende de la dominancia de los factores oncogénicos o de los factores antitumorales. La terapia contra el cáncer puede desencadenar una reacción inflamatoria importante. La radioterapia y algunas quimioterapias causan la muerte de células tumorales, que a su vez lleva a una respuesta inflamatoria sistémica capaz de estimular la presentación de antígenos tumorales. Algunas citoquinas tienen roles opuestos en la inflamación asociada a tumores y la inflamación inducida por la terapia.(25)

Tabla 1. Función de las células inmunes y su actividad anti y protumoral. Adaptado de Chow MT et al. Inflammation and immune surveillance in cancer. Semin Cancer Biol. 2012 (3)

Tipo de células inmune	Actividad protumoral	Actividad antitumoral
Macrófagos	Inmunosupresión, promueve angiogénesis, invasión y metástasis	Produce IL-2 y óxido nítrico
Células dendríticas	Inmunosupresión y vasculogénesis	Producción de IL-12 e IFN tipo 1
Células supresoras de origen mieloide	Supresión de las células antitumorales CD8+, expansión de la población de las células T reguladoras, inducción de la anergia de las células NK	Activación de las células NK
Neutrófilos	Producción de citoquinas	Citotoxicidad mediada por el ligando Fas
Células NK	Supresión de la actividad de las células dendríticas	Producción de IFN-γ, citotoxicidad directa contra el tumor
Células γδ	Supresión de la inmunidad de las células T y de la función de las células dendríticas	Producción de IFN-γ, citotoxicidad directa contra el tumor
Células Th1	-	Producción de citoquinas, inmunidad de las células T CD8+
Células Th2	Producción de citoquinas	Asiste en la eliminación de tumores mediada por eosinófilos
Células Th17	Producción de citoquinas	Producción de citoquinas, activación de los linfocitos T citotóxicos
Células T reguladoras	Inmunosupresión	Supresión de la inflamación promotora de tumores
Células CD8+	Producción de citoquinas	Producción de IFN-γ, citotoxicidad directa contra tumores
Células B	Promoción de la metástasis y promueve el ambiente favorecedor de la formación de tumores	Asiste en la inmunidad de las células CD4+ y CD8+

1.5. Inflamasomas

Los inflamasomas son complejos multiproteicos que se ensamblan en el citosol al detectar patrones moleculares asociados a patógenos o a daño (PAMPs o DAMPs, respectivamente). Su activación es clave para el funcionamiento del sistema inmune innato. Estos complejos multiproteicos están formados por un receptor NOD (NLR), un receptor de AIM2 (ausente en melanoma 2) el ALR, la proteína asociada a apoptosis (ASC) y la procaspasa-1, los cuales pueden ser activados por variación en la concentración iónica y de ATP intracelular y extracelular, por desestabilización del fagolisosoma, por internalización de cristales insolubles o por mecanismos de oxidorreducción; lo cual permitirá la activación de la plataforma molecular y el consiguiente procesamiento de las prointerleuquinas inflamatorias a sus formas activas. De acuerdo con los componentes que los constituyen son denominados inflamasoma NLRP1, NLRP3, NLRC4, NLRP6 o AIM2. (26)

El inflamasoma es el principal complejo de activación de la caspasa-1, pudiendo así mediar la maduración y secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-1β e IL-18. Inflamasomas mutados pueden causar una producción y secreción incrementada de IL-1β, que puede resultar nociva en múltiples enfermedades. El NLRP3 es el inflamasoma mejor caracterizado, su expresión ha sido detectada casi exclusivamente en células que expresan el marcador mieloide CD11b, como neutrófilos, macrófagos, monocitos y células dendríticas convencionales. (3,27)

La activación del inflamasoma se inicia con la fosforilación del receptor específico que se activa ya sea porque reconoce PAMPs o DAMPs; la fosforilación del receptor activa al factor de transcripción NF-kβ, el cual se transloca al núcleo de la célula y promueve la transcripción de la proteína NLRP3, proIL-1β, proIL-18, proIL33 y HMGB-1, que se mantienen en el citoplasma de la célula de forma inactiva. Este proceso se reconoce como la primera señal de inducción para la formación del inflamasoma. La presencia de una segunda señal de activación está dada por la presencia de especies reactivas de oxígeno en el citoplasma, la salida de potasio a través del poro purogénico P2X7 y la entrada de calcio, daño mitocondrial, la ruptura de vesículas de fagolisosomas que liberan catepsinas al espacio intracelular, o bien la existencia de estrés en el microambiente celular; cualquiera de estas vías de activación favorece que NLRP3 interactúe con la proteína adaptadora ASC induciendo así la oligomerización del NLRP3 con la proteína ASC; posteriormente el dominio CARD (caspase activation and recruitment domain) de ASC se une al dominio CARD de la procaspasa-1 dando lugar a la formación del inflamasoma NLRP3 que es en realidad un complejo. Este complejo funciona como catalizador para que la caspasa-14, que es una forma de caspasa de activación clive a la procaspasa-1, entre el dominio CAD y las regiones activas p10/p20 y genere el tetrámero activo caspasa-1/p10/p20, que es una proteasa de cisteínas que al activarse corta a la pro-ILβ, pro-IL-18 y pro-IL-33, lo que contribuye a la activación y secreción de IL-1β, IL-18 e IL-33 maduras (Figura 2).(26)

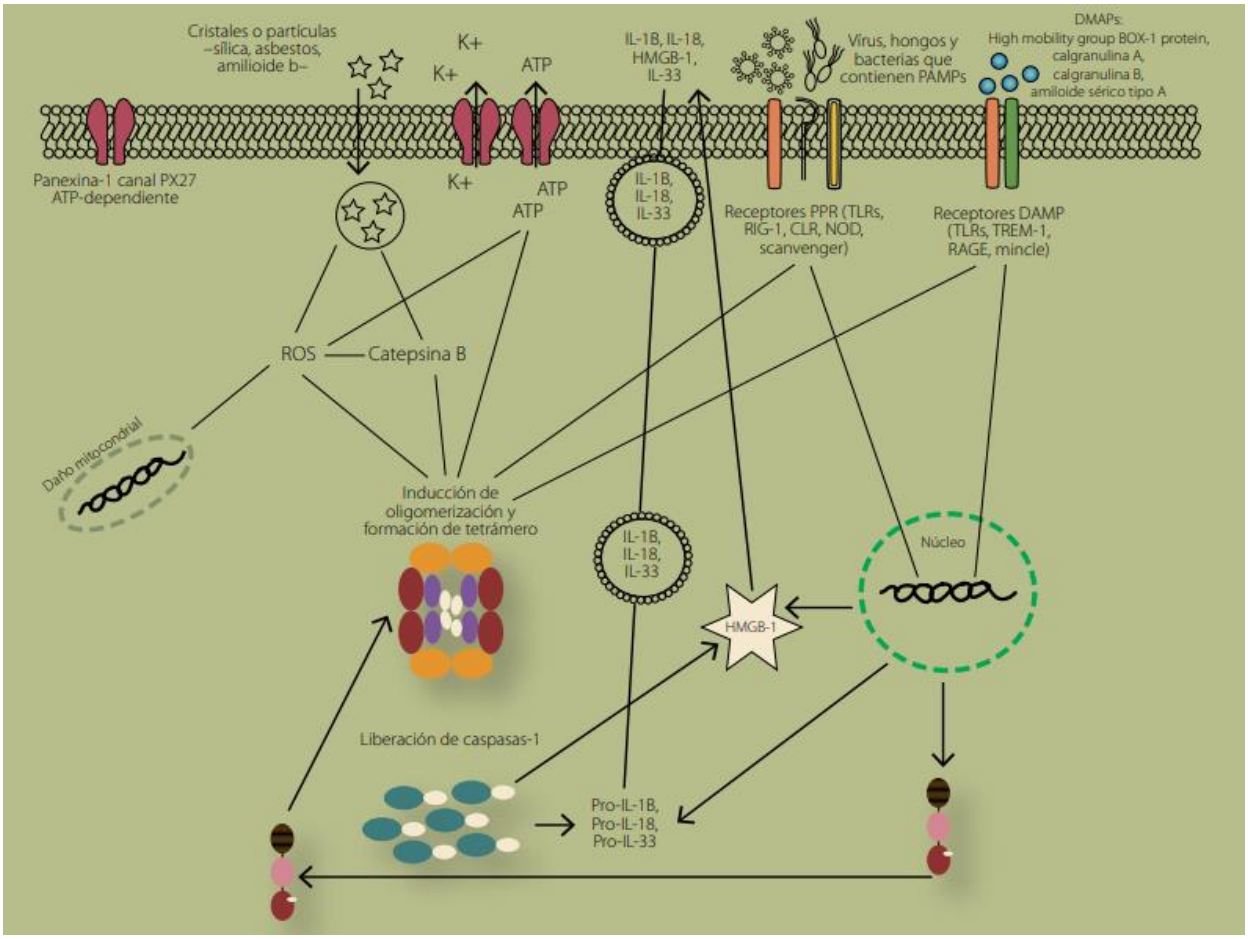


Figura 2. Representación de mecanismos y moléculas que activan la formación del inflamasoma. Tomado de Montaño, Fortoul, Rendón. Rev. Fac. Med. UNAM. (2017) (26)

Los inflamasomas pertenecen al sistema inmune innato; sin embargo, son importantes para la inmunidad adaptativa. Los productos de la activación del inflamasoma tienen efectos sobre células de la inmunidad adaptativa. La IL-1β favorece la diferenciación de las células Th17, así como la reprogramación de las células Treg a células T secretoras de IL-17. Por otro lado, la IL-18 amplifica la producción de IFN-γ por las células Th1. La expresión del receptor de la IL-18 en las células T es aumentada luego de la exposición a IL-12, una citoquina que polariza hacia Th1. A su vez, la citoquina IL-18 induce la expresión del receptor de alta afinidad de IL-12, estableciéndose un ciclo de amplificación. En cambio, en ausencia de citoquinas que polarizan a Th1, la IL-18 puede promover la diferenciación de células Th2.(28) Por lo tanto, la IL-1β e IL-18, generadas por la activación del inflamasoma, son potentes amplificadores de respuestas inmunes adaptativas.

Como se mencionó anteriormente, el cáncer puede surgir como consecuencia de la inflamación crónica. Por lo tanto, la carcinogénesis y la progresión tumoral son estimuladas o inhibidas por procesos inflamatorios e inmunes, respectivamente. Los inflamasomas pueden influenciar la formación, progresión y la respuesta terapéutica del cáncer a través de su contribución en la homeostasis tisular, la inflamación y las respuestas inmunes. La IL-1β podría conducir directamente a oncogénesis o podría inhibir mecanismos de inmunovigilancia, por lo tanto, facilitando el crecimiento tumoral. (28)

Por otro lado, existen evidencias que muestran que productos de la activación del inflamasoma, particularmente IL-1β, tienen roles esenciales en la estimulación de respuestas inmunes adaptativas, importantes en las respuestas contra el cáncer. La IL-1β estimula la secreción de IL-17 por células T γδ y la polarización de respuestas de células T αβ CD8+ hacia IFN-γ. El bloqueo de IL-1β con anakinra o utilizando anticuerpos neutralizantes específicos compromete de forma importante el efecto en la inhibición del crecimiento tumoral por algunos agentes quimioterapéuticos.(29) Además, la IL-1β puede inducir la reprogramación de células T reguladoras a células ex Treg con funciones efectoras, y de esta forma favorecer las respuestas antitumorales.(30)

De los antecedentes aquí expuestos se puede ver que el inflamasoma tiene roles pleiotrópicos y contradictorios en la oncogénesis. Por un lado, afecta positivamente vías de muerte celular autónomas y respuestas inmunes antitumorales, sin embargo, también estimula procesos autócrinos y parácrinos que favorecen la inflamación carcinogénica, el crecimiento tumoral, la metástasis y angiogénesis. Por lo tanto, dependiendo del tipo de cáncer y del estadio de este, la inhibición del inflamasoma puede ser una opción terapéutica o ser contraindicado.(29)

La activación del inflamasoma, como se mencionó anteriormente, puede ocurrir en diferentes poblaciones celulares, tanto en células del sistema inmune, como células dendríticas y macrófagos, como por células no inmunes como pueden ser las células epiteliales. El estudio del inflamasoma clásicamente se realiza en células dendríticas o macrófagos. Generalmente se utilizan cultivos celulares primarios de células dendríticas o macrófagos diferenciados a partir de monocitos de sangre periférica de humanos.

1.6. Tmem176b/Tmem176a

Tmem176b (TORID) y Tmem176a (HCA-112) son proteínas intracelulares transmembrana que pertenecen a la familia de proteínas MS4A (del inglés "*Membrane-Spanning 4-Domains subfamily A*").(31) Estudios filogenéticos sugieren que los genes TMEM176 comparten un gen ancestral común con la familia de genes MS4A, pero que divergieron y sufrieron expansión independiente.(31,32) Estas proteínas presentan cuatro dominios transmembrana hidrofóbicos interconectados por un "loop" intracelular y dos "loops" extracelulares con ambos extremos N- y C-terminal hacia el citosol (Figura 3).(33) Mediante análisis de la secuencia de Tmem176b, Eon Kuek et al. predicen que Tmem176b contiene un motivo ITIM (del inglés "*Inmunoreceptor Tyrosin-based Inhibitory Motif*"), estos motivos clásicamente se asocian con la propagación intracelular de señales inhibidoras. La relevancia fisiológica de esta predicción resta por ser explorada. Tmem176b y Tmem176a se localizan en el cromosoma 7q36.1 en humanos y en el 6B2.3 en ratones.

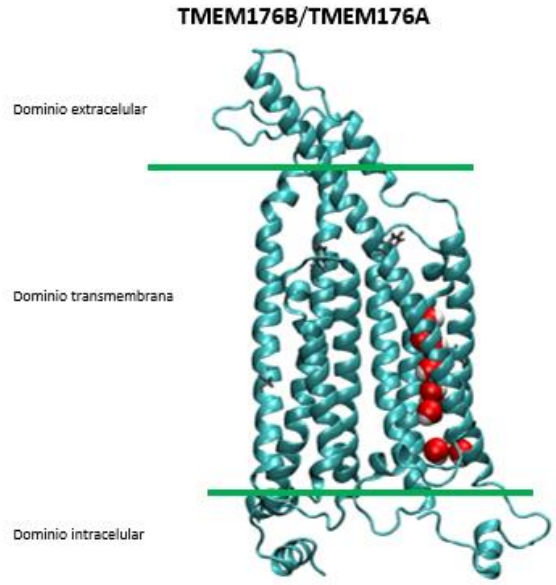


Figura 3. Modelado de Tmem176b y Tmem176a. Hecho por Ignacio J General, Universidad Nacional de San Martín, Argentina

Tanto Tmem176b como Tmem176a están expresados de forma ubicua. Se ha reportado alta expresión de ARNm de Tmem176b en pulmón, riñón, nódulos linfáticos y bazo. El patrón de expresión de Tmem176a es similar, encontrándose alta expresión en pulmón, riñón y bazo. (34) A nivel de expresión en subtipos de células del sistema inmune, Tmem176a y Tmem176b presentan una alta expresión en células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDCs) y en células dendríticas convencionales. También están expresados en granulocitos, monocitos y en células dendríticas plasmocitoides. (34) La expresión de Tmem176b y Tmem176a ha sido asociada al estado inmaduro de los monocitos y células dendríticas, disminuyendo su expresión notoriamente luego de la estimulación inflamatoria. (34) Se cree que Tmem176b y Tmem176a interaccionan físicamente formando multímeros. (34)

Haciendo hincapié en TORID (del inglés "*TOlerance Related and InduceD*"), recientemente se ha reportado que regula el pH fagosomal en BMDCs y de esa manera controla el procesamiento de antígenos exógenos para ser cargados en el MHC de clase I (vía de la presentación cruzada). (35) Estudios en oocitos de *Xenopus* en complemento de estudios en BMDCs demostraron que Tmem176b es un canal/transportador iónico, que en la membrana de fagosomas regula el pasaje de cationes lo que impacta directamente en la actividad V-ATPasa y de esa manera en el pH fagosomal. (35)

Tmem176a y Tmem176b han sido asociados con el cáncer. Tmem176a humano fue inicialmente identificado en una búsqueda de antígenos asociados a tumor en carcinoma hepatocelular. (36) Más recientemente, se ha reportado una acumulación anormal de Tmem176a y de Tmem176b en determinados tipos de cáncer. (37) Cuajungco et al. observaron una mayor expresión de Tmem176a en carcinoma de pulmón con respecto a tejido normal, así como un aumento en la expresión de Tmem176a y Tmem176b en linfoma. A su vez, vieron que la relación entre la expresión de Tmem176a y Tmem176b cambiaba significativamente en pacientes con cáncer de mama, de hígado, de tejido linfoide y de piel, con respecto a pacientes normales. (37) Por otro lado, se ha reportado una sobreexpresión de Tmem176b en células endoteliales tumorales, estando involucrada en la migración de estas células. (38) Recientemente se reportó niveles aumentados del ARNm de Tmem176b y Tmem176a en tejidos de cáncer gástrico

comparado con tejido gástrico normal. (39) En dicho trabajo, Sun et al. también mostraron que mayores niveles de ARNm de Tmem176b y Tmem176a se asocia con una peor sobrevida de los pacientes con cáncer gástrico.

Gong et al. mostraron el impacto del transporte de iones mediado por TORID en el citosol; proponían que uno de los procesos que está fuertemente regulado por iones en el citosol es la activación del inflamasoma, plasmando la idea que el aumento citosólico de calcio junto con la disminución de potasio y anión cloruro son fuertes desencadenantes de la activación del inflamasoma. (40) Nuestro equipo de investigación especula que, a través de dicho manejo de iones, es que Tmem176b puede regular la activación del inflamasoma. Recientemente se mostró que TORID inhibe la activación del inflamasoma NLRP3 tanto en modelos in vitro como in vivo mediado por mecanismos iónicos. (41) En un modelo de cáncer colorrectal se asoció la expresión de Tmem176b estromal con una disminución en la sobrevida de pacientes humanos, sugiriendo que dicha proteína juega un rol protumoral. (41)

De los antecedentes desarrollados se desprende el rol de Tmem176b en la regulación del sistema inmune, al ser un canal iónico, podría modular la activación del inflamasoma NLRP3 al influir en la homeostasis iónica, y de esta forma tener un rol en la respuesta inmune antitumoral.

1.7. El compuesto BayK8644

BayK8644 emerge como un inhibidor de Tmem176b que controla el crecimiento tumoral y mejora la eficacia de numerosas inmunoterapias como lo puede ser la inmunoterapia anti-PD1.(41) Estudios in vitro mostraron que BayK8644 es un fuerte inhibidor de TORID que controla la progresión tumoral de manera dependiente a la activación del inflamasoma a su vez que mejora los bloqueadores de “inmune checkpoints” mediante dicha activación. (41) A partir de ensayos de co-localizacion, nuestro equipo de investigación ha probado que existe una interacción física entre el compuesto y la proteína diana que es la responsable de la perdida de actividad de TORID; además, se llevaron a cabo ensayos de co-inmunoprecipitacion lográndose co-inmunoprecipitar Tmem176b con BayK8644 afirmando que ambos compuestos interactúan físicamente. (No publicado)

A partir de estos hallazgos surge el interés en estudiar dicha interacción BayK8644/Tmem176b, con el fin de poder comprender de mejor forma como es que este canal iónico funciona a nivel molecular, para crear nuevas generaciones de BayK8644 con el objetivo de mejorar su eficacia antitumoral.

Por otra parte, en la búsqueda por entender cómo funciona este canal iónico a nivel molecular, Pontillo y colaboradores descubrieron un SNP (polimorfismo de un único nucleótido), donde se sustituye una alanina por una treonina (A134T), y evidenciaron que esta variante genética estaba asociada con una mejor sobrevida en pacientes que sufren cáncer colorrectal, al mismo tiempo, observaron que en células dendríticas y monocitos de personas que poseen dicha mutación, existía un aumento en la secreción de IL-1β in vitro. (1)

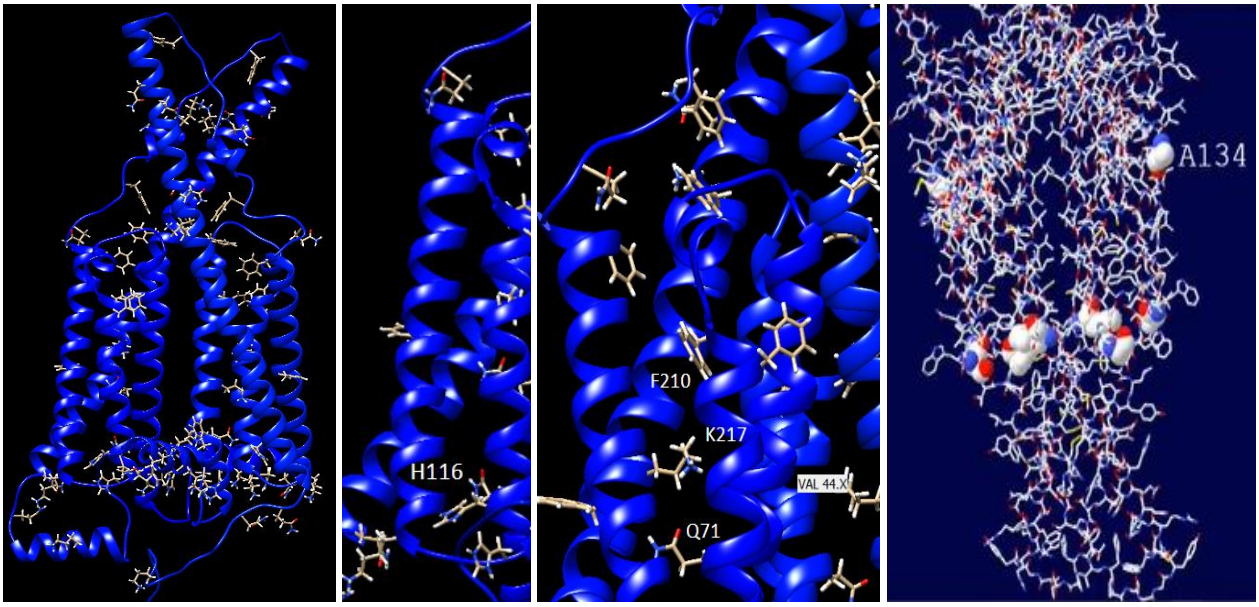


Figura 4. Modelaje tipo “AlphaFold” de la secuencia de Tmem176b humano. Se resaltan los aminoácidos considerados claves en el marco de este proyecto; la alanina 134 (A134) junto con algunos que componen el presunto poro, la histidina 116 (H116), la fenilalanina 210 (F210), la fenilalanina 203 (F203), la lisina 217 (K217) y la glutamina 71 (Q71). Hecho en colaboración con el biólogo estructural Dr. Felipe Trajtenberg.

Profundizando un poco más en el mecanismo de transporte iónico de Tmem176b, se maneja la hipótesis que los aminoácidos marcados en el dominio transmembrana de la proteína (Figura 4) podrían funcionar como una especie de poro de pasaje para el canal y que la mutación A134T podría provocar un cambio en el ángulo de la hélice alfa que podría impactar en dicho poro, generando una modulación en la actividad de TORID que podría llegar a ser positiva con un aumento de la actividad del canal iónico; o negativa con una inhibición total o parcial. Particularmente, se especula que estos residuos aminoacídicos formen parte del supuesto poro debido a la posición de las cadenas laterales hacia la luz del poro putativo y debido a sus características de hidrofobicidad.

Dicha hipótesis acerca del poro de TORID surge a partir de la colaboración de nuestro equipo con el biólogo estructural Dr. Felipe Trajtenberg, a partir de la cual se realizó un modelado y análisis computacional de Tmem176b a través del algoritmo “AlphaFold” (Figura 4). A partir de esto, se identificó este poro putativo el cual requiere validación experimental. Creemos que los residuos aminoacídicos que forman este supuesto poro podrían ser blanco de la molécula inhibidora BayK8644. Esto podría significar que, al conocer más acerca de este poro, podrían emerger nuevas generaciones de fármacos derivados de BayK8644, a partir de estrategias de diseño racional de drogas, que tengan como dianas a los aminoácidos críticos que componen el poro de TORID.

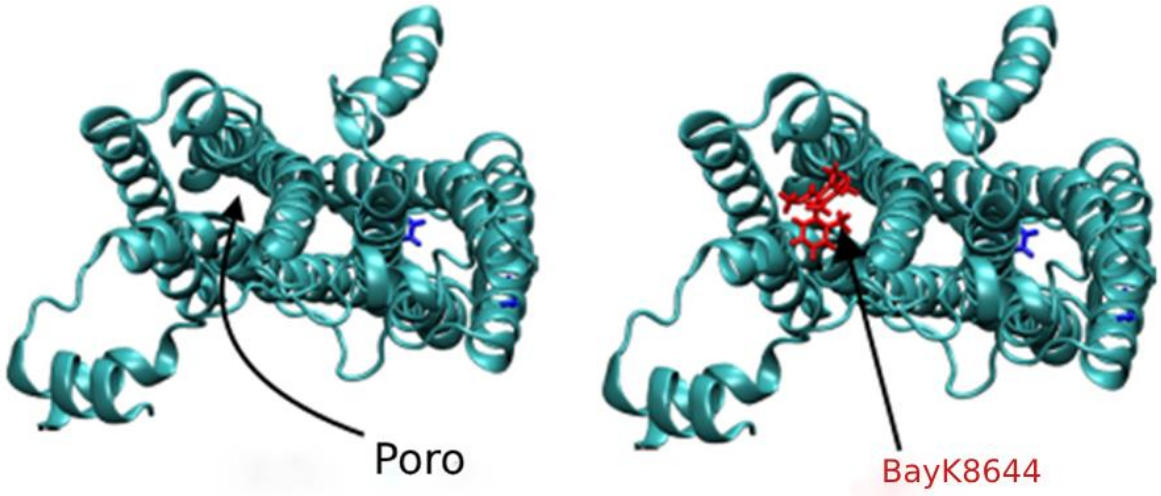


Figura 5. Modelaje del presunto poro del canal iónico y unión hipotética del compuesto BayK8644 a la proteína Tmem176b. Hecho por Russo et al, proyecto en preparación.

Datos no publicados de nuestro equipo de investigación sugieren que al medir la actividad de la proteína “wild type” y compararla con un mutante que sustituye la fenilalanina 203, que forma parte del presunto poro, por una alanina (F203A) existía una mayor conductancia por parte del canal mutado, reforzando la creencia que dicho conjunto de aminoácidos tienen un rol de poro; además, se perdió la capacidad de bloquear la inhibición de TORID con BayK8644 en este mutante, sugiriendo que además de que estos aminoácidos con rol de presunto poro tienen una gran importancia a la hora de modular la actividad del canal iónico, también tienen un rol clave en la interacción con el compuesto BayK8644 (Figura 5). Estos descubrimientos son prometedores para continuar entendiendo como mejorar inhibidores y como entender los mecanismos moleculares del manejo de iones de este canal; problemáticas claves a abordar para el proceso de diseño racional de fármacos.

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo fue contribuir a la validación experimental del poro putativo identificado como un posible blanco farmacológico.

Dado que una de las perspectivas de este trabajo a corto plazo es evaluar nuevos inhibidores de Tmem176b in vivo, comenzamos también a poner a punto un modelo murino de cáncer de colon con el que se evaluaran nuevos inhibidores de Tmem176b.

Los objetivos específicos planteados fueron:

1) Correlacionar mutantes de Tmem176b entre especies de ratones y humanos.

2) Estudiar la actividad de mutantes de Tmem176b.

3) Poner a punto un modelo murino de cáncer de colon.

3. Metodología

3.1. Líneas celulares

La línea celular de hámster *Chinese Hamster Ovary* (CHO), fue cultivada en medio DMEM (del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con 10% SBF (Suero Fetal Bovino), 10% Buffer HEPES, 10% MEM-aminoácidos no esenciales y 10% penistrepto. Mientras que la línea celular de origen murino MC38 (cáncer colorrectal) fue cultivada en medio RPMI (del inglés, *Roswell Park Memorial Institute*) suplementado con 10% SBF y 10% penistrepto. Todas las líneas celulares se mantuvieron en estufa a 37°C en presencia de 5% de CO2.

3.2. Ratones

Se utilizaron ratones C57BL/6 “littermates” de entre 6 y 12 semanas. Los ratones fueron criados en la Unidad de Biotecnología de Animales de Laboratorio (UBAL) del Institut Pasteur de Montevideo en condiciones libres de patógenos específicos (SPF). Éstos fueron mantenidos en un ambiente controlado, con temperatura entre 19 y 21°C, y ciclos de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Los ratones recibieron agua y ración estéril administradas en condiciones ad libitum. Se contó con un aval de la CEUA para el trabajo con ratones.

3.3. Diseño de plásmidos

Para el cumplimiento de los objetivos de este trabajo fueron utilizados un total de ocho plásmidos diferentes. Su diseño deriva del modelo pmCherry-N1 (Anexo 1) que presenta la secuencia codificante para la proteina fluorescente mCherry, se menciona como “plásmido control”. Derivado de este plásmido es que surgen los otros siete. A uno se le agrego la secuencia de la proteina Tmem176b en estado nativo o “wild type” (Anexo 2), y, a los demás se les agregó esta misma secuencia de la proteina, pero con una mutación que modifica un único aminoácido de una posición especifica que creemos se encuentra en el hipotético poro (Anexo 3). Dichas mutaciones son: A128T, Q71A, K217A, H116A, F210A y F210W. La totalidad de los plásmidos fueron diseñados y fabricados por la empresa GenScript.

3.4. Alineamiento de la secuencia de Tmem176b en diferentes especies utilizando herramientas bioinformáticas

Con el objetivo de poder trabajar tanto en modelos murinos como en humanos a la hora de estudiar las mutaciones de TORID, se realizó un ensayo de alineamiento local con la herramienta bioinformática BLASTP (“*Basic Local Alignment Search Tool for Proteins”*). Particularmente, se pretendió estudiar a la mutación A134T de la secuencia de Tmem176b de humanos (codificada por el polimorfismo mencionado anteriormente), pero en un modelado murino. Es por ello que, como existen diferencias entre los genomas de ambas especies, se comprobó, mediante la utilización de esta herramienta bioinformática, si dicha alanina en la posición 134 de la secuencia aminoacídica de TORID en humanos efectivamente se encontraba en la misma posición en la secuencia aminoacídica de ratones o si su posición difería.

3.5. Transfección

Antes de comenzar el proceso de transfección se verifico la morfología de las células CHO y que no exista una cantidad considerable de células muertas en el sobrenadante. Para la transfección de células CHO se siguió el protocolo de “Lipofectamine® LTX and Plus™ Reagent” de Invitrogen, Thermo Fisher Scientific de tres días.

En el día uno, se realizó el conteo celular de una botella T-75 confluente con células CHO y se calculó el volumen necesario para sembrar 2,0e6 células en cada una de las placas de Petri (cada placa de Petri corresponde a un plásmido transfectado diferente). Una vez agregado dicho volumen de células se adiciono a cada una de las placas 5 mL de medio de cultivo para células CHO y se dejó incubando en estufa a 37°C en presencia de 5% de CO2 hasta el día dos.

En el segundo día, se realizó la transfección con el kit de “Lipofectamine™ LTX Reagent” de Invitrogen, Thermo Fisher Scientific. Para comenzar, se revisaron las células plaqueadas el día anterior y se verifico en microscopio óptico que presenten una confluencia entre el 70 y 90%, además de un bajo, o nulo, número de células muertas. Una vez verificados estos aspectos, se inició el protocolo de transfección con el agregado de 15 µL del reagente “Plus™ Reagent” a una cantidad equivalente al número de placas de Petri del día uno, de tubos eppendorf de volumen 1,5 mL con 750 µL de medio RPMI. Posteriormente, se agregó a cada uno de los tubos la cantidad de plásmido correspondiente; 3,33 µg de plásmido control, 5 µg de plásmido TORID “wild type” y 5 µg de plásmido TORID mutado. Los plásmidos utilizados fueron: un plásmido control del fluoróforo mCherry ausente de la secuencia de la proteína Tmem176b (Anexo 1), un plásmido con la secuencia “wild type” del canal iónico Tmem176b (Anexo 2) y plásmidos conteniendo la secuencia mutada de la proteína Tmem176b (se utilizaron secuencias codificantes para las mutaciones A128T, Q71A, K217A, F210A, F210W y H116A) (Anexo 3). Una vez adicionados los plásmidos, se dejaron incubando durante 15 minutos a una temperatura de 25°C. Pasado el tiempo de incubación, se agregó a tubos Falcon de 15 mL con 750 µL de medio RPMI una cantidad de 45 µL del reagente “Lipofectamine™ LTX Reagent” y se dejaron incubando durante 15 minutos a una temperatura de 25°C. Transcurrido ese tiempo, se adiciono a los tubos Falcon, que contienen medio RPMI junto con el reagente “Lipofectamine Plus Reagent”, el contenido de los tubos eppendorf previamente adicionados con los plásmidos y se agregó, de forma uniforme, la mezcla correspondiente a cada una de las placas. Previamente cada una de las placas de Petri que contienen las células CHO a transfectar fueron lavadas con PBS para limpiar cualquier traza de medio de cultivo presente con el fin de evitar la inhibición de la lipofectamina con suero fetal bovino. Se dejaron incubando en estufa a 37°C en presencia de 5% de CO2 durante 4 horas. Transcurrido ese tiempo, se agregó a cada una de las placas 5 mL de medio de cultivo con el fin de desactivar la lipofectamina y así evitar un efecto citotóxico en las células por su exposición prolongada a la lipofectamina. Inmediatamente, se volvió a dejar incubando en estufa a 37°C en presencia de 5% de CO2 hasta el próximo día.

En el día tres se levantaron las células CHO transfectadas con los diferentes plásmidos de las placas de Petri, se realizó un conteo celular para saber la cantidad de células por mililitro que hay en cada placa, y se llevó a una concentración de 1,5e6 células/mL con PBS 1X en tubos Falcon.

Acto seguido, se trabajó en una placa de 96 pocillos con fondo en “V”. Se colocaron 100 µL de cada una de las muestras (plásmido control, plásmido TORID “wild type” y plásmido/s TORID mutado/s) por quintuplicado en dos filas distintas (Figura 6). Se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se agregó 100 µL de la solución de sonda ANG-2 (“Asante NaTRIUM Green 2”, sonda fluorescente sensible a Na^+) que previamente fue preparada en una dilución 1 en 10.000 de PBS 1X junto con el compuesto pluronic, el cual ayuda a aumentar la solubilidad de la sonda. A continuación, se cubrió la placa con papel aluminio y se dejó incubando a 37°C durante 30 minutos.

Una vez pasada la media hora, centrifugamos, descartamos el sobrenadante, realizamos un lavado con 100 µL de PBS 1X, centrifugamos nuevamente, y descartamos el sobrenadante. Estos pasos se repitieron una vez más. Luego del último descarte, se agregó para cada muestra: en la fila superior 100 µL de medio normal (buffer fosfato que contiene Na^+) y en la fila inferior 100 µL de medio NMDG (del inglés*, N-metil-D-glucamine*, sustituto del Na^+) (Figura 6).

La molécula impermeable NMDG actúa como un sustituto del ion Na^+; a diferencia del buffer fosfato con sodio, el NMDG no activa al canal iónico, por lo tanto, en dichas condiciones se estaría suprimiendo la actividad de Tmem176b. De esta forma se descartan uniones inespecíficas de la sonda que no tengan relación con el canal iónico. Una vez agregados los medios estándar y NMDG se procede a pasar cada pocillo de las muestras a otra placa de 96 pocillos, pero de color negro para minimizar el "background" en la lectura de fluorescencia.

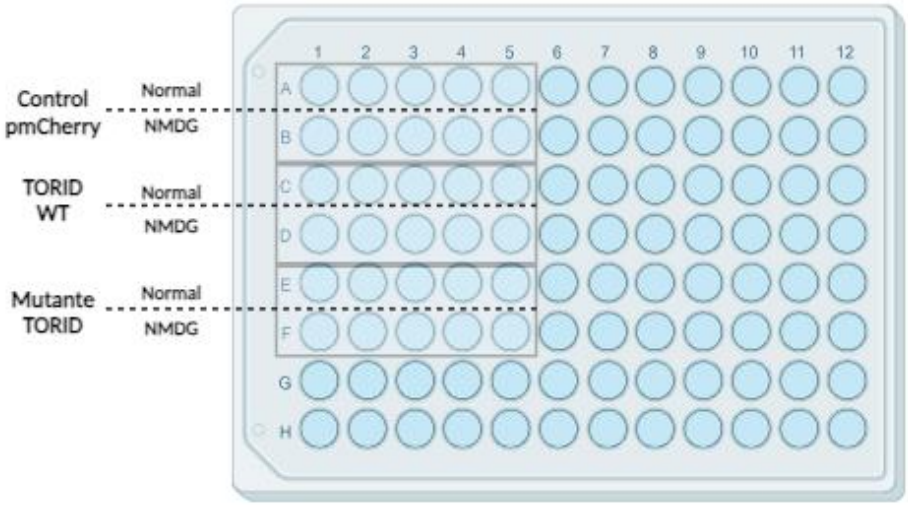


Figura 6. Esquema representativo de la disposición de las muestras en placa de 96 pocillos. Se sembraron todas las muestras por quintuplicado en dos filas distintas, una con medio estándar y otra con medio NMDG. Hecho en BioRender.com

Hecho esto, se llevó la placa al equipo Varioskan LUX para medir la fluorescencia de la sonda y así poder conocer la actividad del canal en cada una de las muestras. Para ello se utilizó el software SkanIt Software 4.1 for Microplate Readers. En cuanto a los parámetros utilizados en equipo, se utilizó una temperatura de incubación de 37°C durante toda la lectura, una longitud de onda de excitación de 525 nm y una de emisión de 545 nm para ANG-2 y se realizó un total de 100 lecturas de una duración de 1 minuto cada una.

El equipo Varioskan LUX devuelve una gráfica de fluorescencia en función del tiempo para cada una de las muestras con dos curvas, una correspondiente a la misma muestra con medio normal y otra asociada a la muestra con medio NMDG. Se determinó para ambas el área debajo de la curva, y se calculó la diferencia entre dichas áreas, este valor se presento en graficas de tipo barras a partir del software GraphPad Prism 8.

Posteriormente se analizó cada una de las muestras en el citómetro de flujo Attune NxT para conocer el porcentaje de transfección de las células en las condiciones control, "wild type" y mutantes. De esta forma se aseguró que si existiera una diferencia de actividad entre los mutantes y las células "wild type" no sería debido a que existe una mayor cantidad de copias del plásmido que emiten el fluoróforo mCherry y por

ende indicarían, de forma errónea, una actividad aumentada del canal iónico Tmem176b; sino que dicha diferencia nació a raíz de que, efectivamente, existe una diferencia en las actividades de la proteína entre sus estados nativo y mutado.

3.6. Puesta a punto de un modelo terapéutico de cáncer en murinos

Para la puesta a punto de un modelaje murino tumoral se utilizó la línea celular de cáncer colorrectal murino MC38. En ratones macho o hembra C57BL/6 de 6-12 semanas de edad, de dos poblaciones diferentes, se inyecto por vía subcutánea ya sea 1,0e6 o 2,0e6 células dependiendo la población, de cinco ratones cada una. Se controló el crecimiento tumoral por palpación cada 1-2 días una semana luego de la inyección y se midió manualmente a partir de un calibrador. El tamaño del tumor se calculó como: diámetro mayor x diámetro menor, expresándose en mm^2. Los ratones fueron eutanasiados cuando cumplían con el criterio de punto final. De acuerdo con el protocolo de ética aprobado, como punto final se tomó el deterioro notorio del animal, ulceración o un tumor de tamaño superior a 20 mm de diámetro.

El volumen tumoral en mm^2 a lo largo del tiempo fue graficado utilizando el software GraphPad Prism 8. Como criterio de elección para la mejor condición de inyección de células MC38 se estableció la opción con la cual se generaba el crecimiento tumoral en los ratones con la menor cantidad de células.

4. Resultados y Discusión

El presente capítulo describe los resultados obtenidos en este trabajo.

4.1. Estudio de alineamiento de secuencias de Tmem176b humano y murino

Los resultados del alineamiento realizado entre las secuencias aminoacídicas de Tmem176b en *Mus musculus* y *Homo sapiens* (Figura 7) indican que no existe una conservación absoluta de la posición aminoacídica de la alanina 134 de la secuencia de Tmem176b en humanos.

```
NP_001273580.1      GKLSGQVSCLLLLACIATAAAATVLGVNSLIRQTSVPYYVEIFSTCNPLQSSMD-PGYGT 173
Mus musculus

NP_001094782.1      GKLAGYISSLLTLAGFATAMAAVVLCVNSFIWQTEPFLY--IDTVCDRSDPVFPTTGYRW 178
Homo sapiens
                    . * .  * ** **    . *: *: : ::  :       :    :         *
```

Figura 7. Alineamiento local de secuencias aminoacídicas de la proteina Tmem176b. Se marca en rojo la alanina que es idéntica en su posición correspondiente en las secuencias. Posición 128 en *Mus musculus* (arriba) y posición 134 en *Homo sapiens* (abajo). Hecho con la herramienta bioinformática BLASTP (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Dichos resultados muestran que la alanina de la posición 134 en humanos no sería equivalente en la secuencia aminoacídica de ratones. En cambio, este estudio da a entender que la posición de dicho aminoácido, de gran importancia a la hora de modular la actividad del canal iónico, estaría presente en la posición 128 en ratones. En otras palabras, si se quiere estudiar la mutación A134T de un modelo humano en un modelo murino, se deberá estudiar en cambio, la sustitución de la alanina situada en la posición 128 por una treonina con el fin de tener una concordancia de resultados en ambos modelados.

Estos resultados abren una ventana para la experimentación y generación de ratones con la mutación inactivadora de Tmem176b, lo cual permitiría el estudio en modelos in vivo del polimorfismo codificante y su implicancia en otros modelos de cáncer diferentes al colorrectal.

4.2. Estudio de actividad de mutantes de Tmem176b para la validación funcional del poro hipotético

Se comenzó estudiando el mutante de TORID A128T en un modelo murino (dicha mutación correspondería a la variante A134T en un modelo humano, tal como se demostró anteriormente), y se obtuvieron los resultados presentados en la Figura 8.

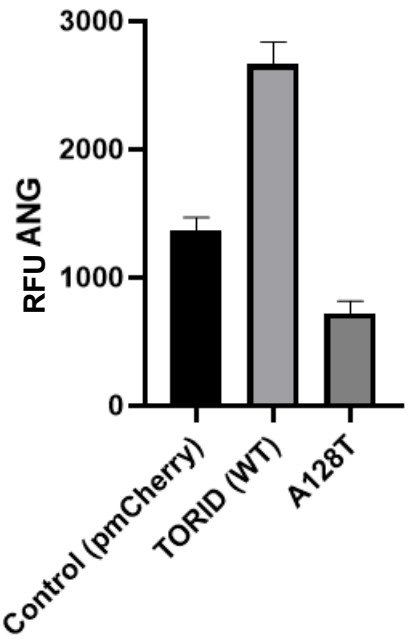


Figura 8. Ensayo de actividad del mutante A128T. Se midió la actividad del canal iónico a partir de las unidades relativas de fluorescencia (RFU) de la sonda ANG-2, restando en cada condición el RFU obtenido en medio NMDG (medio libre de Na^+). Los resultados corresponden al promedio de cinco réplicas de medidas de fluorescencia. La sonda fue excitada a 525 nm y se midió la emisión a 545 nm. De izquierda a derecha se presenta: la medida de RFU del control, que determina si existe o no una presunta actividad inhibida o aumentada; la medida de RFU de la proteína TORID en su estado nativo, es decir sin ninguna mutación; y la medida de RFU de la variante genética A128T de TORID.

En dicha figura observamos la medida de actividad del canal iónico Tmem176b (la cual se correlaciona con la cuantificación del flujo medio de intensidad, MFI, de ANG-2) en su estado nativo (o “wild type”), y en su estado mutado con la variante genética A128T. Tomando como referencia a la condición control, observamos que si transfectamos células con la proteína en estado nativo tenemos una actividad aumentada que es completamente bloqueada cuando trabajamos con el mutante A128T, especulamos que dicha mutación puede ser una “loss of function” o mutación inactivadora. Esta información es relevante para poder interpretar que pacientes podrían beneficiarse y cuales no de la inhibición farmacológica de Tmem176b. En otras palabras, los pacientes con la variante genética inactivada, la cual es codificada por el polimorfismo citado anteriormente, no deberían beneficiarse del tratamiento con inhibidores de TORID.

Estos resultados reafirman la hipótesis que teníamos de que dicho aminoácido juega un papel clave en la modulación de la actividad del canal iónico de una forma que, aún no se conoce a ciencia cierta, pero que manejamos la teoría puede deberse a un cambio en el ángulo de la hélice alfa de la proteína que podría impactar en el poro que creemos es de suma importancia para la correcta actividad de TORID.

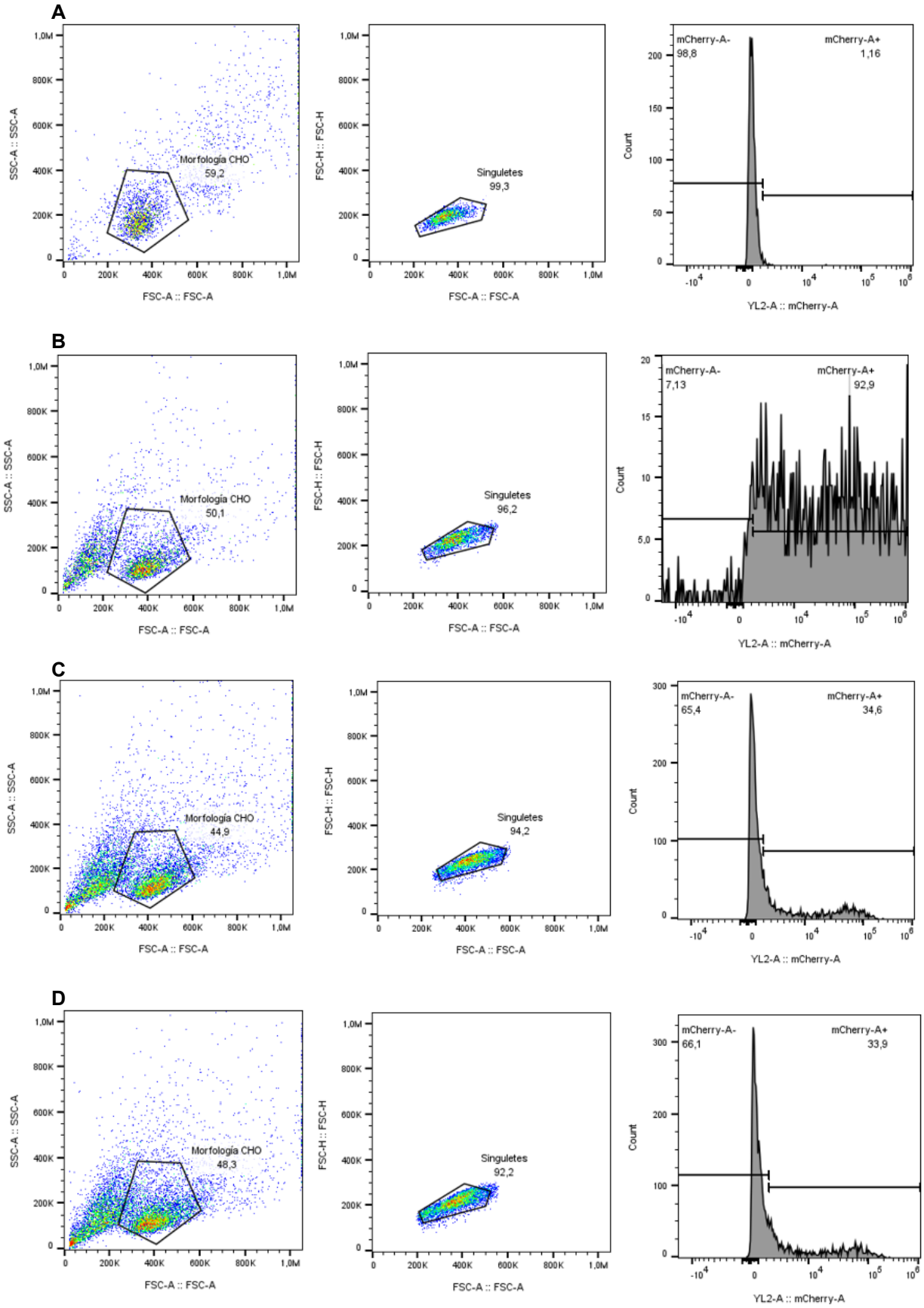

A
SSC-A :: SSC-A
FSC-A :: FSC-A
Morfología CHO
59,2
FSC-H :: FSC-H
Singuletes
99,3
Count
mCherry-A-
98,8
mCherry-A+
1,16
YL2-A :: mCherry-A
B
Morfología CHO
50,1
Singuletes
96,2
mCherry-A-
7,13
mCherry-A+
92,9
C
Morfología CHO
44,9
Singuletes
94,2
mCherry-A-
65,4
mCherry-A+
34,6
D
Morfología CHO
48,3
Singuletes
92,2
mCherry-A-
66,1
mCherry-A+
33,9

Figura 9. Estudio del porcentaje de células transfectadas con el fluorocromo mCherry de muestras correspondientes al mutante A128T. Para cada muestra se determinó la morfología y tamaño de interés de las células CHO a partir del grafico de Side Scatter Area (SSCA) vs Forward Scatter Area (FSCA). Dentro de dicha población se aislaron las células no agregadas, es decir, los singuletes, a partir del grafico de Forward Scatter Area (FSCA) vs Forward Scatter Height (FSCH). Por último, se determinó, dentro de esta última población, la cantidad de células transfectadas a partir del histograma que estudia la señal captada por el láser YL2 asociado a mCherry en cada una de las células. Se utilizo como referencia para determinar la población objetivo y el umbral de fluorescencia de mCherry una muestra de células CHO sin transfectar (A). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido control pmCherry (B). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido Tmem176b "wild type" (C). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido Tmem176b mutado con la variante genética A128T (D).

Para verificar que realmente la diferencia de actividad entre el canal iónico mutado y en estado nativo estaba causada por diferentes grados de actividad y no por una mayor señal de fluorescencia de mCherry (derivada por un mayor número de copias del plásmido en las células CHO), se obtuvo el porcentaje de células transfectadas (mCherry positivas) a partir del citómetro de flujo Attune NxT y se comparó en las diferentes muestras. Para ello, en primer lugar, se analizó en el citómetro una muestra de células CHO sin transfectar (Figura 9A), para establecer la morfología y tamaño de las células de interés con el fin de no analizar células muertas o restos celulares. Luego, dentro de esa población, se seleccionaron los singuletes para así evitar células que formen agregados o conglomerados. Dentro de la población escogida, se midieron los niveles de fluorescencia del fluorocromo mCherry con el láser "yellow-green" y filtro 620/15 nm del citómetro y se determinó el umbral para el cual toda señal situada a su derecha sería considerada positiva y toda señal a su izquierda sería considerada como negativa. Los "gates" para especificar dicha población celular se trasladaron a los demás gráficos de las diferentes muestras (Figuras 9B,9C,9D).

Comparando los histogramas de fluorescencia del canal en estado nativo (Figura 9C) y mutado con la variante A128T (Figura 9D), de 34,6% y 33,9% respectivamente, verificamos que no existe una diferencia significativa como para pensar que las diferencias de actividad que se muestran en la Figura 8 no provienen de unos niveles de conductancia iónica disparejos. Es decir, todo lleva a pensar que dicha actividad que está bloqueada en el mutante provendría por la mutación que sufre y no por un número de copias del plásmido disminuidas con respecto a su contraparte.

Continuando con el estudio de los mutantes, se decidió estudiar las variantes genéticas K217A (mutación correspondiente a la sustitución de la lisina de la posición 217 en la secuencia aminoacídica de TORID por una alanina) y Q71A (mutación correspondiente a la sustitución de la glutamina situada en la posición 71 en la secuencia por una alanina). Se cree que ambos aminoácidos forman parte del poro putativo (Figura 4), el cual hipotetizamos podría jugar un rol fundamental en la modulación de la actividad del canal iónico.

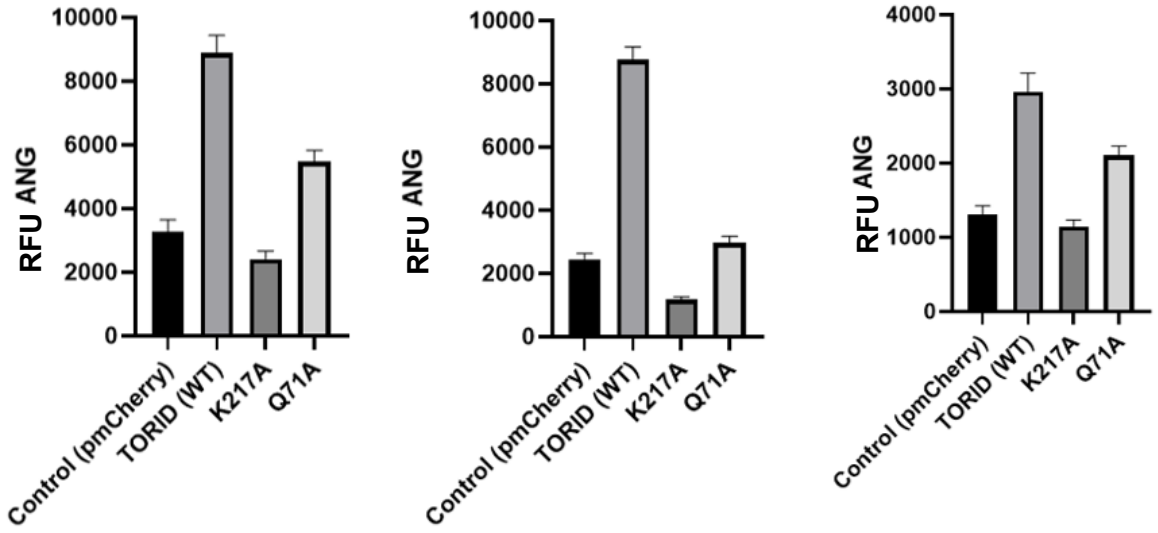
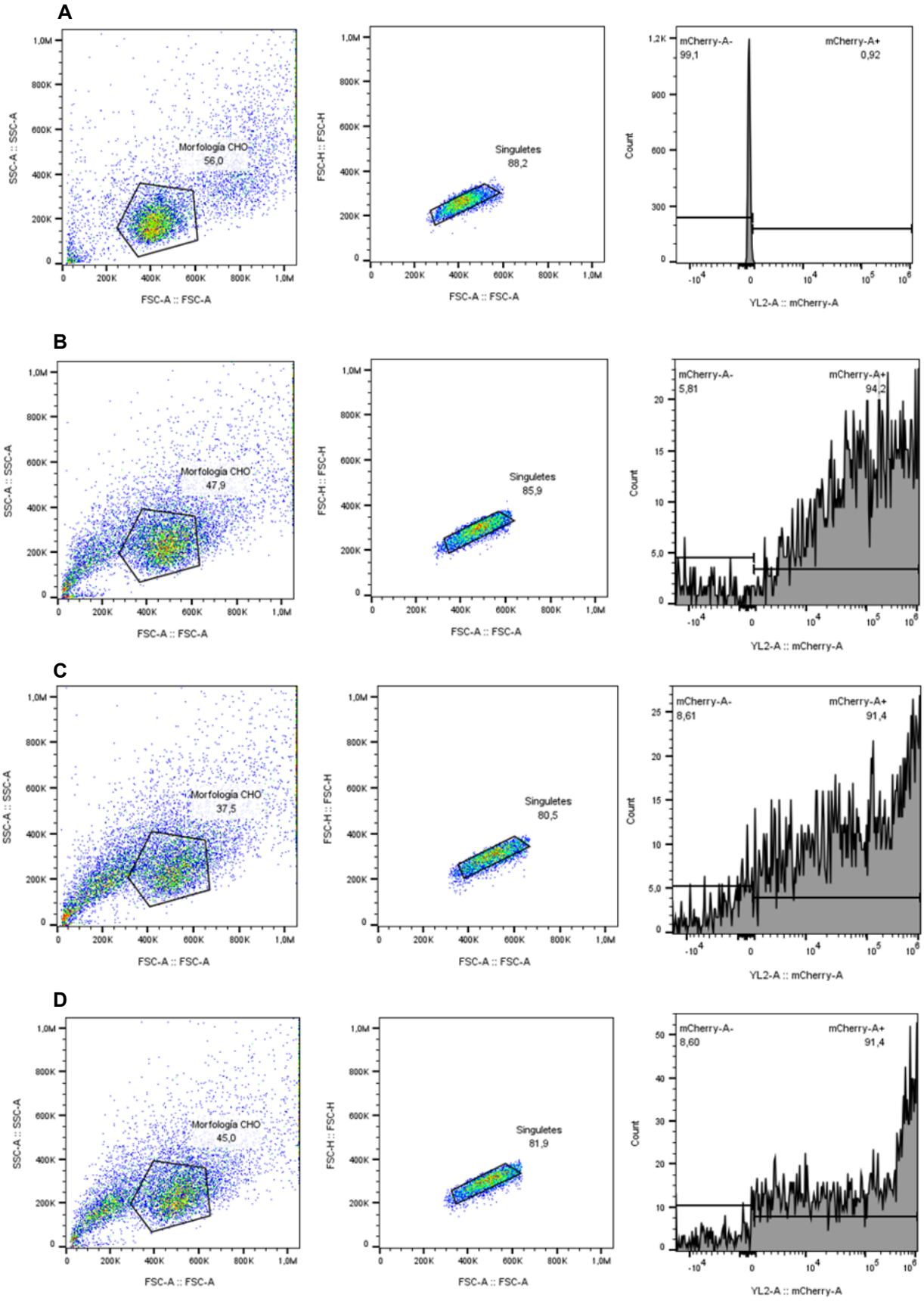


Figura 10. Ensayo de actividad de los mutantes K217A y Q71A. Se presentan los resultados de tres experimentos independientes para los mutantes. Se midió la actividad del canal iónico a partir de las unidades relativas de fluorescencia (RFU) de la sonda ANG-2, restando en cada condición el RFU obtenido en medio NMDG (medio libre de Na^+). Los resultados corresponden al promedio de cinco réplicas de medidas de fluorescencia. La sonda fue excitada a 525 nm y se midió la emisión a 545 nm. De izquierda a derecha se presenta: la medida de RFU del control, que determina si existe o no una presunta actividad inhibida o aumentada; la medida de RFU de la proteína TORID en su estado nativo, es decir sin ninguna mutación; la medida de la variante genética K217A de TORID; y la medida de la actividad de la variante genética Q71A de TORID.

A diferencia de la mutación estudiada previamente, las variantes K217A y Q71A no cuentan con un polimorfismo conocido asociado desde el cual son codificadas. Es por ello que, al no contar con información que asocie alguna de estas mutaciones con la sobrevida de pacientes que padecen una enfermedad carcinógena, no se puede realizar una hipótesis a ciencia cierta de cómo afectarían a la actividad del canal.

En la Figura 10, se muestran los estudios independientes de la actividad de la proteína canal iónico, mutada con las variantes K217A y Q71A. Los tres gráficos de barras indican tendencias similares, tomando como referencia de umbral al control (pmCherry) y como nivel de actividad nativa a la muestra TORID “wild type”. Podemos interpretar que, cuando el canal iónico es afectado por la mutación Q71A, se tiene como resultado una perdida parcial de la actividad, puesto que, a pesar de no llegar un nivel de señal menor que el control, que supondría una pérdida total de la actividad del canal, se puede observar una tendencia de dicha variante que se correlaciona con una actividad significativamente menor que la proteina en su estado nativo. Por otra parte, en el caso del mutante K217A, se advierten en las tres graficas unos niveles de actividad menores a la condición control, esto muestra que dicha variante genética podría estar provocando una inhibición total de la actividad en el canal iónico.


A
SSC-A :: SSC-A
FSC-A :: FSC-A
Morfologia CHO
56,0
FSC-H :: FSC-H
Singuletes
88,2
Count
mCherry-A-
99,1
mCherry-A+
0,92
YL2-A :: mCherry-A
B
Morfologia CHO
47,9
Singuletes
85,9
mCherry-A-
5,81
mCherry-A+
94,2
C
Morfologia CHO
37,5
Singuletes
80,5
mCherry-A-
8,61
mCherry-A+
91,4
D
Morfologia CHO
45,0
Singuletes
81,9
mCherry-A-
8,60
mCherry-A+
91,4

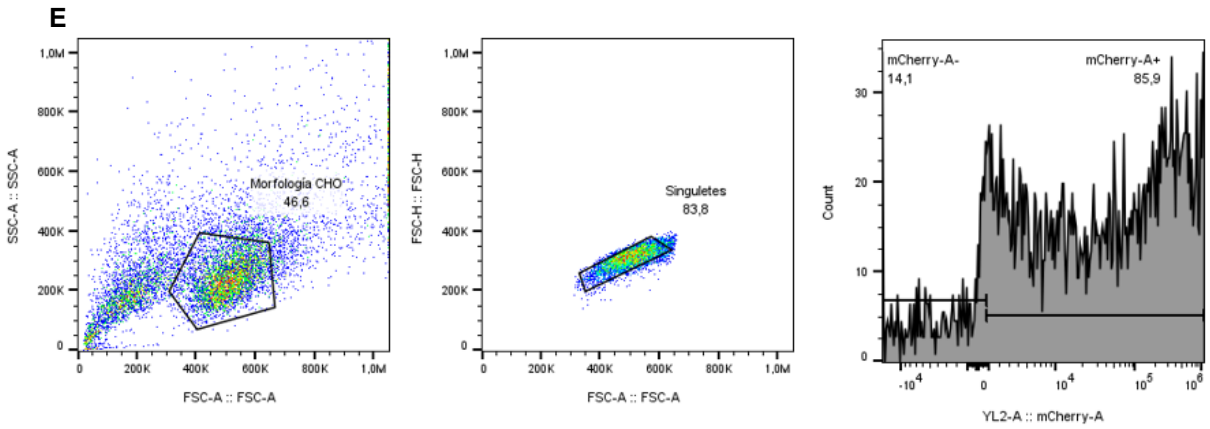
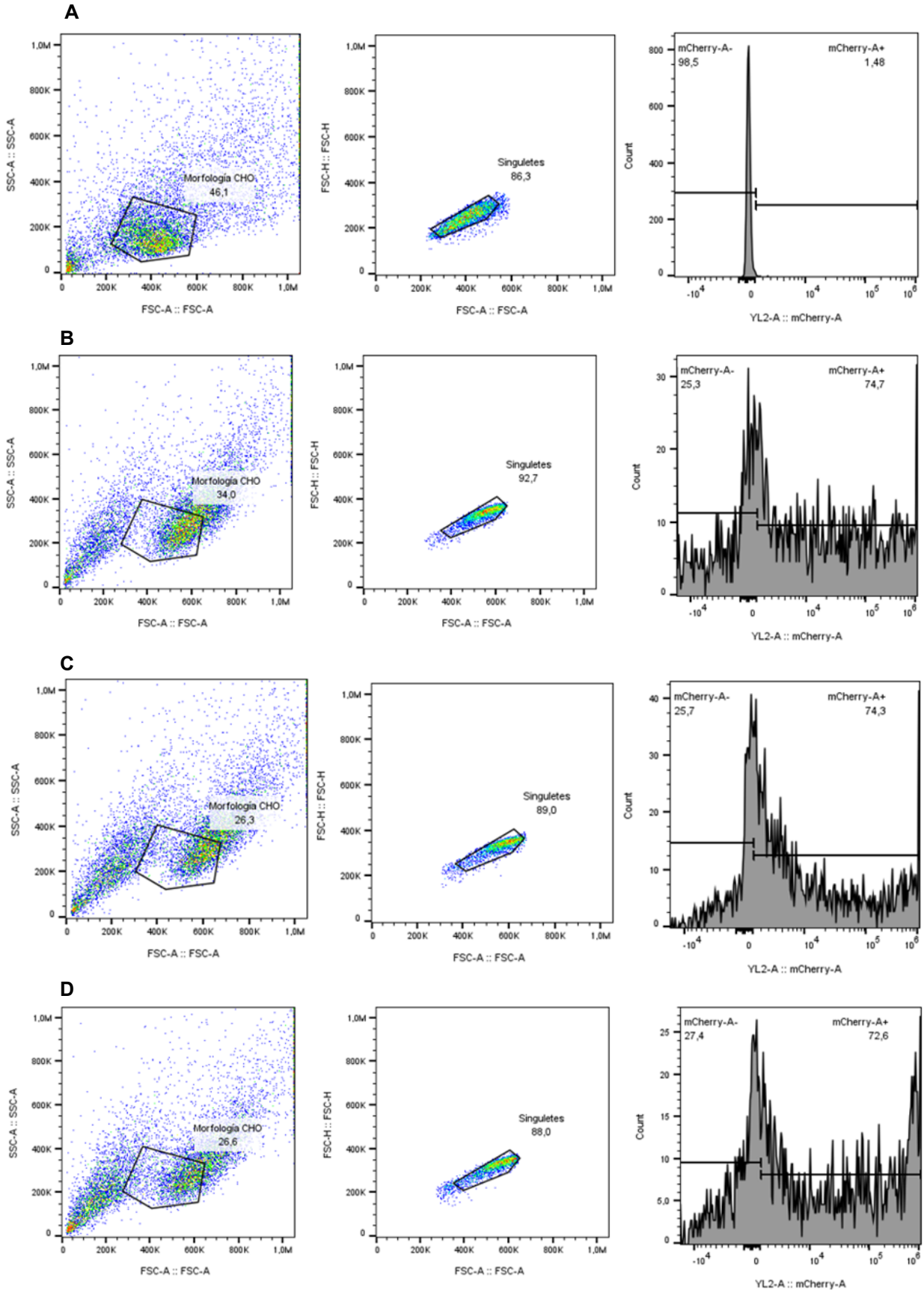


Figura 11. Primer replicado del estudio del porcentaje de células transfectadas con el fluorocromo mCherry de muestras correspondientes a los mutantes Q71A y K217A. Para cada muestra se determinó la morfología y tamaño de interés de las células CHO a partir del grafico de Side Scatter Area (SSCA) vs Forward Scatter Area (FSCA). Dentro de dicha población se aislaron las células no agregadas, es decir, los singuletes, a partir del grafico de Forward Scatter Area (FSCA) vs Forward Scatter Height (FSCH). Por último, se determinó dentro de esta última población, la cantidad de células transfectadas a partir del histograma que estudia la señal captada por el láser YL2 asociado a mCherry en cada una de las células. Se utilizo como referencia para determinar la población objetivo y el umbral de fluorescencia de mCherry una muestra de células CHO sin transfectar (A). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido control pmCherry (B). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido Tmem176b "wild type" (C). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido Tmem176b mutado con la variante genética Q71A (D). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido Tmem176b mutado con la variante genética K217A (E).

Tal como se hizo anteriormente, para asegurar que realmente la diferencia de actividad entre el canal iónico mutado y en estado nativo estaba causada por diferentes niveles de actividad y no por una mayor señal de fluorescencia de mCherry, causada por un mayor número de copias del plásmido, se analizaron y compararon los niveles de transfección de las células de los ensayos triplicados correspondientes a los mutantes K217A y Q71A (Figura 11, Figura 12 y Figura 13).

En el primer experimento, que corresponde a la primera grafica de barras de la Figura 9, la cantidad de células transfectadas con el plásmido Q71A fue de un 91,4% (Figura 11D), mientras que hay un 85,9% de células transfectadas con el plásmido K217A (Figura 11E). Al relacionar estos valores con el 91,4% de transfección de la muestra de células con la proteina en estado nativo (Figura 11C), es posible afirmar que los niveles de actividad disminuidos o bloqueados de los mutantes con respecto a la muestra "wild type" se deben a una diferencia en la actividad de la proteina canal iónico por causa de dichas alteraciones genéticas y no por una mayor cantidad de copias del plásmido que incluye la proteína fluorescente mCherry.


A
SSC-A :: SSC-A
FSC-A :: FSC-A
Morfologia CHO
46,1
FSC-H :: FSC-H
Singuletes
86,3
mCherry-A-
98,5
mCherry-A+
1,48
Count
YL2-A :: mCherry-A
B
Morfologia CHO
34,0
Singuletes
92,7
mCherry-A-
25,3
mCherry-A+
74,7
C
Morfologia CHO
26,3
Singuletes
89,0
mCherry-A-
25,7
mCherry-A+
74,3
D
Morfologia CHO
26,6
Singuletes
88,0
mCherry-A-
27,4
mCherry-A+
72,6

E

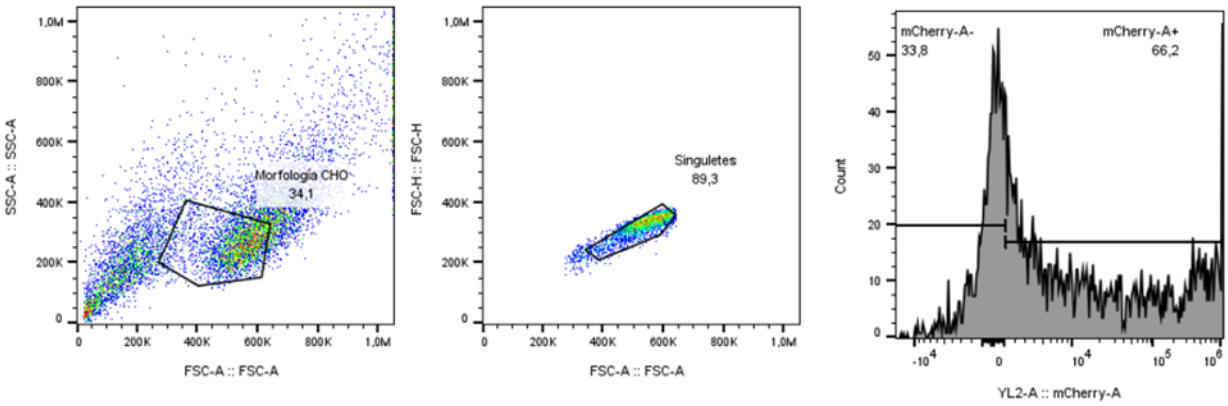
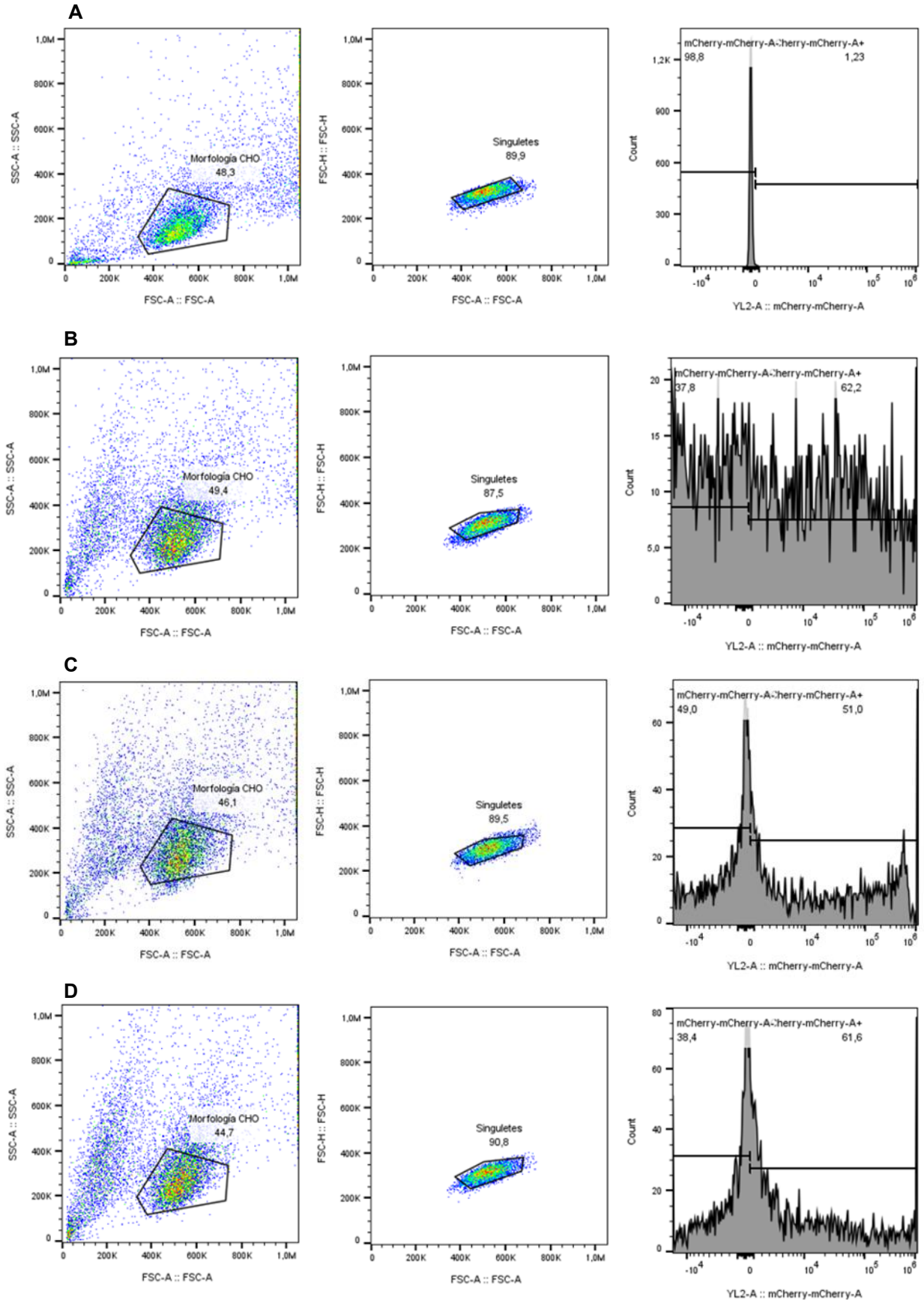


Figura 12. Segundo replicado del estudio del porcentaje de células transfectadas con el fluorocromo mCherry de muestras correspondientes a los mutantes Q71A y K217A. Para cada muestra se determinó la morfología y tamaño de interés de las células CHO a partir del grafico de Side Scatter Area (SSCA) vs Forward Scatter Area (FSCA). Dentro de dicha población se aislaron las células no agregadas, es decir, los singuletes, a partir del grafico de Forward Scatter Area (FSCA) vs Forward Scatter Height (FSCH). Por último, se determinó dentro de esta última población, la cantidad de células transfectadas a partir del histograma que estudia la señal captada por el láser YL2 asociado a mCherry en cada una de las células. Se utilizo como referencia para determinar la población objetivo y el umbral de fluorescencia de mCherry una muestra de células CHO sin transfectar (A). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido control pmCherry (B). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido Tmem176b "wild type" (C). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido Tmem176b mutado con la variante genética Q71A (D). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido Tmem176b mutado con la variante genética K217A (E).

Pasando al segundo ensayo del triplicado, correspondiente al segundo grafico de barras de la Figura 10, se observa una transfección del 72,6% de las células con la mutación Q71A (Figura 12D), un 66,2% que corresponde a las células con la variante K217A (Figura 12E) y un 74,3% en el caso de las células con la proteina Tmem176b en estado nativo. A partir de estos tres valores similares se puede desprender la misma conclusión que en la primera replica, dando a entender que los niveles de actividad de la proteina presentados en la Figura 10 son causados efectivamente por los mutantes.

Por último, con respecto a la tercera replica, también se obtuvieron porcentajes similares para los mutantes Q71A, K217A y para la proteina nativa TORID, siendo estos de 61,6% (Figura 13D), 62,3% (Figura 13E) y 51,0% (Figura 13C) respectivamente; reafirmando las conclusiones que se desprendieron de las ultimas replicas.


A
SSC-A :: SSC-A
FSC-A :: FSC-A
Morfologia CHO
48,3
FSC-H :: FSC-H
Singuletes
89,9
mCherry-mCherry-A- herry-mCherry-A+
98,8
1,23
Count
YL2-A :: mCherry-mCherry-A
B
Morfologia CHO
49,4
Singuletes
87,5
37,8
62,2
C
Morfologia CHO
46,1
Singuletes
89,5
49,0
51,0
D
Morfologia CHO
44,7
Singuletes
90,8
38,4
61,6

E

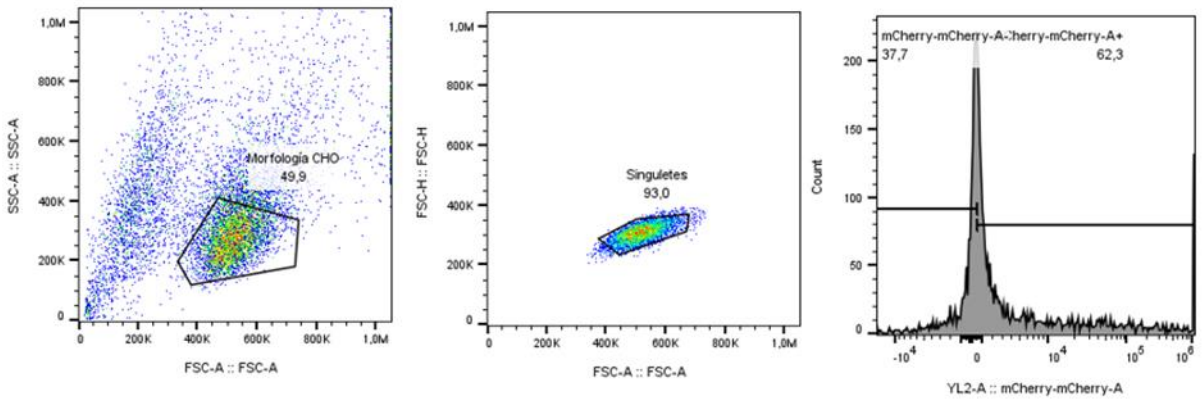


Figura 13. Tercer replicado del estudio del porcentaje de células transfectadas con el fluorocromo mCherry de muestras correspondientes a los mutantes Q71A y K217A. Para cada muestra se determinó la morfología y tamaño de interés de las células CHO a partir del grafico de Side Scatter Area (SSCA) vs Forward Scatter Area (FSCA). Dentro de dicha población se aislaron las células no agregadas, es decir, los singuletes, a partir del grafico de Forward Scatter Area (FSCA) vs Forward Scatter Height (FSCH). Por último, se determinó, dentro de esta última población, la cantidad de células transfectadas a partir del histograma que estudia la señal captada por el láser YL2 asociado a mCherry en cada una de las células. Se utilizó como referencia para determinar la población objetivo y el umbral de fluorescencia de mCherry una muestra de células CHO sin transfectar (A). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido control pmCherry (B). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido Tmem176b "wild type" (C). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido Tmem176b mutado con la variante genética Q71A (D). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido Tmem176b mutado con la variante genética K217A (E).

Continuando con el análisis de las diferentes mutaciones de Tmem176b en el poro teórico, en la Figura 14 se observa el estudio de actividad en las alteraciones H116A (mutación correspondiente a la sustitución de la histidina de la posición 116 en la secuencia aminoacídica de TORID por una alanina), F210A (mutación correspondiente a la sustitución de la fenilalanina situada en la posición 210 en la secuencia por una alanina) y F210W (mutación correspondiente a la sustitución de la fenilalanina 210 por un triptófano). Los resultados en ambos experimentos independientes estarían indicando que no existe una diferencia significativa entre los niveles de actividad de la proteina es su estado nativo y en sus estados mutados con estas variantes. A partir de dichos resultados, se puede hipotetizar que estos aminoácidos no formen parte del posible poro, o quizás, sean parte de su estructura, pero no ejerzan un rol influyente a la hora de modular la actividad de la proteina.

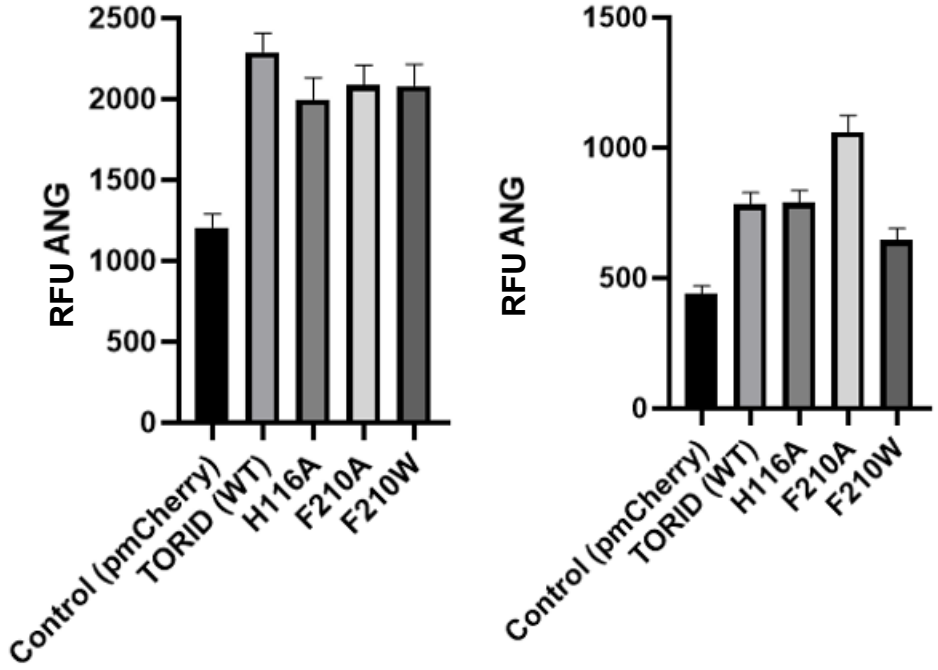
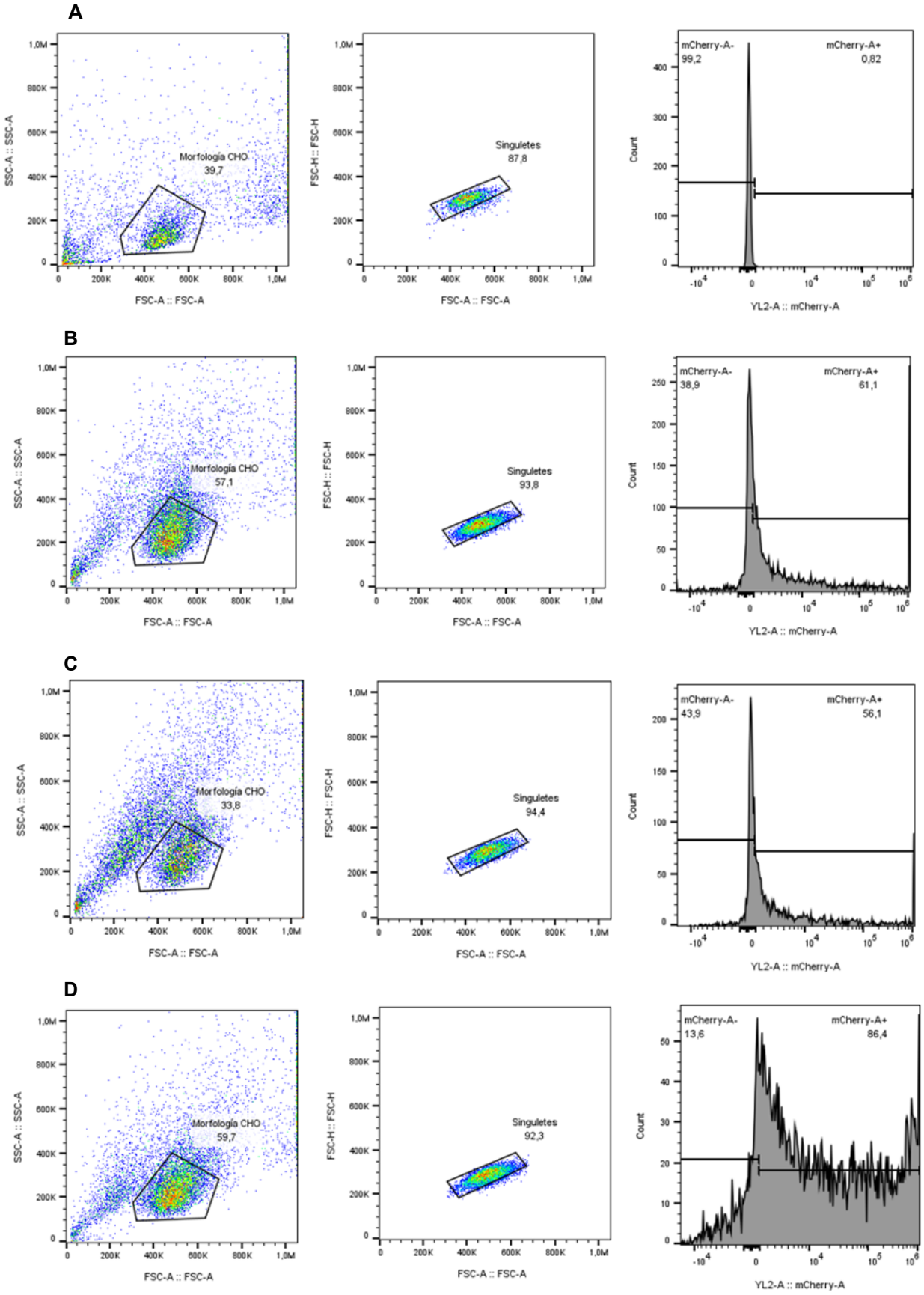


Figura 14. Ensayo de actividad de los mutantes H116A, F210A y F210W. Se presentan los resultados de dos experimentos independientes para los mutantes. Se midió la actividad del canal iónico a partir de las unidades relativas de fluorescencia (RFU) de la sonda ANG-2, restando en cada condición el RFU obtenido en medio NMDG (medio libre de Na^+). Los resultados corresponden al promedio de cinco réplicas de medidas de fluorescencia. La sonda fue excitada a 525 nm y se midió la emisión a 545 nm. De izquierda a derecha se presenta: la medida de RFU del control, que determina si existe o no una presunta actividad inhibida o aumentada; la medida de la proteína TORID en su estado nativo, es decir sin ninguna mutación; la medida de la variante genética H116A de TORID; la medida de la actividad de la variante genética F210A en TORID; y la medida de actividad de la variante F210W.

Al igual que en los otros mutantes se estudió por citometría de flujo la cantidad de células que emitían una señal positiva para mCherry (Figura 15 y Figura 16). Haciendo hincapié en el primer ensayo de estos mutantes (Figura 15), observamos que el porcentaje de transfección de la muestra “wild type” es de un 56,1% (Figura 15C), mientras que el de las alteraciones H116A, F210A y F210W es de un 86,4%, 64,0% y 74,4% respectivamente (Figura 15D, 15E, 15F). Al presentar esto, podemos advertir una distribución dispareja de dichos valores que podría desencadenar en una sobreestimación de la actividad de las muestras con porcentajes mayores y/o una subestimación de la actividad de las muestras con porcentajes menores.

Lo mismo ocurre, aunque en una menor medida, en el segundo ensayo del duplicado (Figura 16), percatamos que la muestra “wild type” presenta un porcentaje del 75,3% (Figura 16C) y las variantes H116A, F210A y F210W del 61,5% (Figura 16D), 55,7% (Figura 16E) y 73,7% (Figura 16F) respectivamente. Es por ello que se debe ser cauto a la hora de sacar conclusiones acerca de la acción de estos mutantes en la proteina canal iónico; con el fin de tener un análisis más certero en este aspecto se decidió realizar un último estudio comparando al mutante K217A, que supuestamente presenta una actividad completamente bloqueada (surgiendo como una mutación inactivadora o “loss of function” tal como A128T), con los mutantes H116A, F210A y F210W que podrían tratarse de mutaciones inocuas para la función del canal (Figura 17).


A
SSC-A :: SSC-A
FSC-A :: FSC-A
Morfología CHO
39,7
FSC-H :: FSC-H
Singuletes
87,8
mCherry-A-
99,2
mCherry-A+
0,82
Count
YL2-A :: mCherry-A
B
Morfología CHO
57,1
Singuletes
93,8
mCherry-A-
38,9
mCherry-A+
61,1
C
Morfología CHO
33,8
Singuletes
94,4
mCherry-A-
43,9
mCherry-A+
56,1
D
Morfología CHO
59,7
Singuletes
92,3
mCherry-A-
13,6
mCherry-A+
86,4

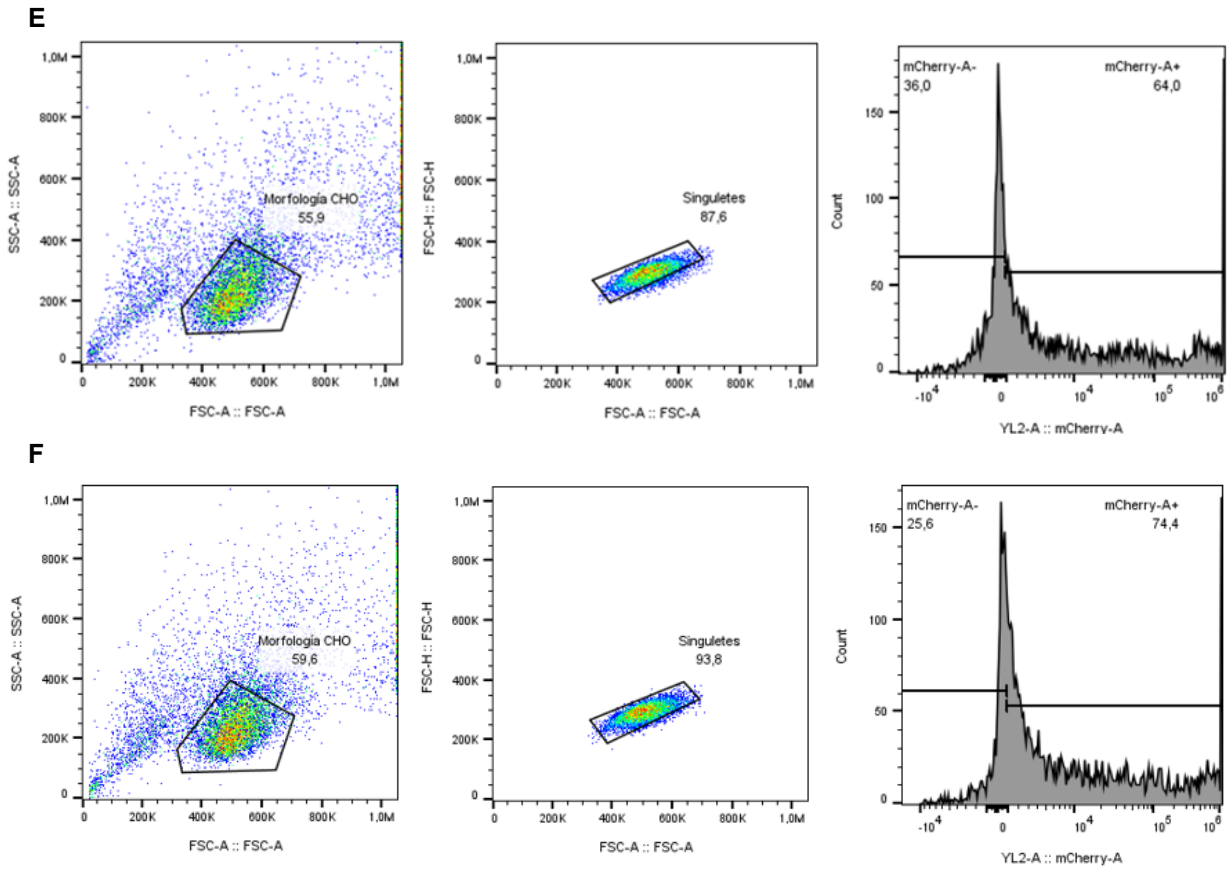
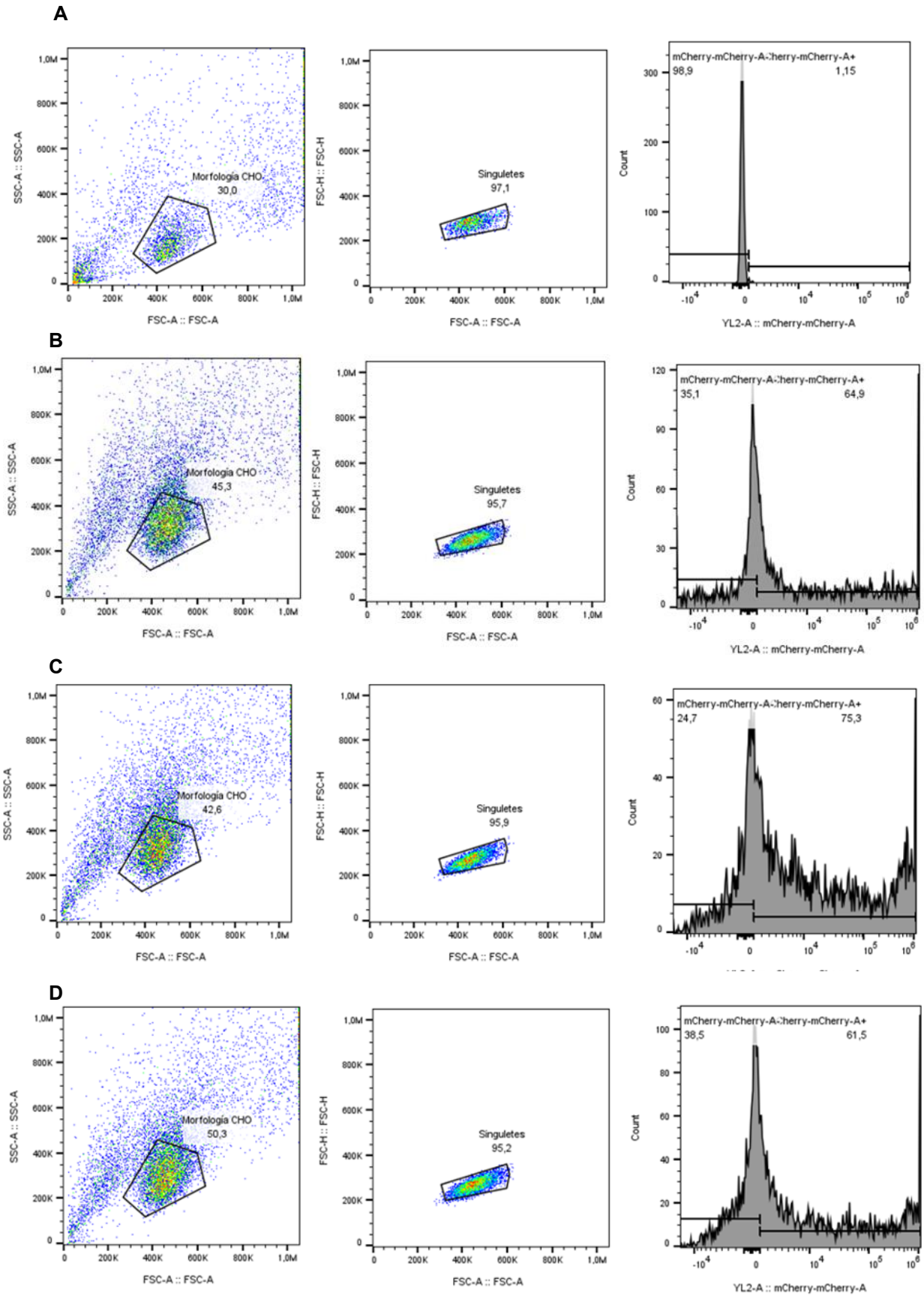


Figura 15. Primera réplica del estudio del porcentaje de células transfectadas con el fluorocromo mCherry de muestras correspondientes a los mutantes H116A, F210A y F210W. Para cada muestra se determinó la morfología y tamaño de interés de las células CHO a partir del grafico de Side Scatter Area (SSCA) vs Forward Scatter Area (FSCA). Dentro de dicha población se aislaron las células no agregadas, es decir, los singuletes, a partir del grafico de Forward Scatter Area (FSCA) vs Forward Scatter Height (FSCH). Por último, se determinó, dentro de esta última población, la cantidad de células transfectadas a partir del histograma que estudia la señal captada por el láser YL2 asociado a mCherry en cada una de las células. Se utilizo como referencia para determinar la población objetivo y el umbral de fluorescencia de mCherry una muestra de células CHO sin transfectar (A). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido control pmCherry (B). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido Tmem176b “wild type” (C). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido Tmem176b mutado con la variante genética H116A (D). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido Tmem176b mutado con la variante genética F210A (E). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido Tmem176b mutado con la variante genética F210W (F).


A
SSC-A :: SSC-A
FSC-A :: FSC-A
Morfologia CHO
30,0
FSC-H :: FSC-H
Singuletes
97,1
mCherry-mCherry-A-:herry-mCherry-A+
98,9
1,15
Count
YL2-A :: mCherry-mCherry-A
B
Morfologia CHO
45,3
Singuletes
95,7
35,1
64,9
C
Morfologia CHO
42,6
Singuletes
95,9
24,7
75,3
D
Morfologia CHO
50,3
Singuletes
95,2
38,5
61,5

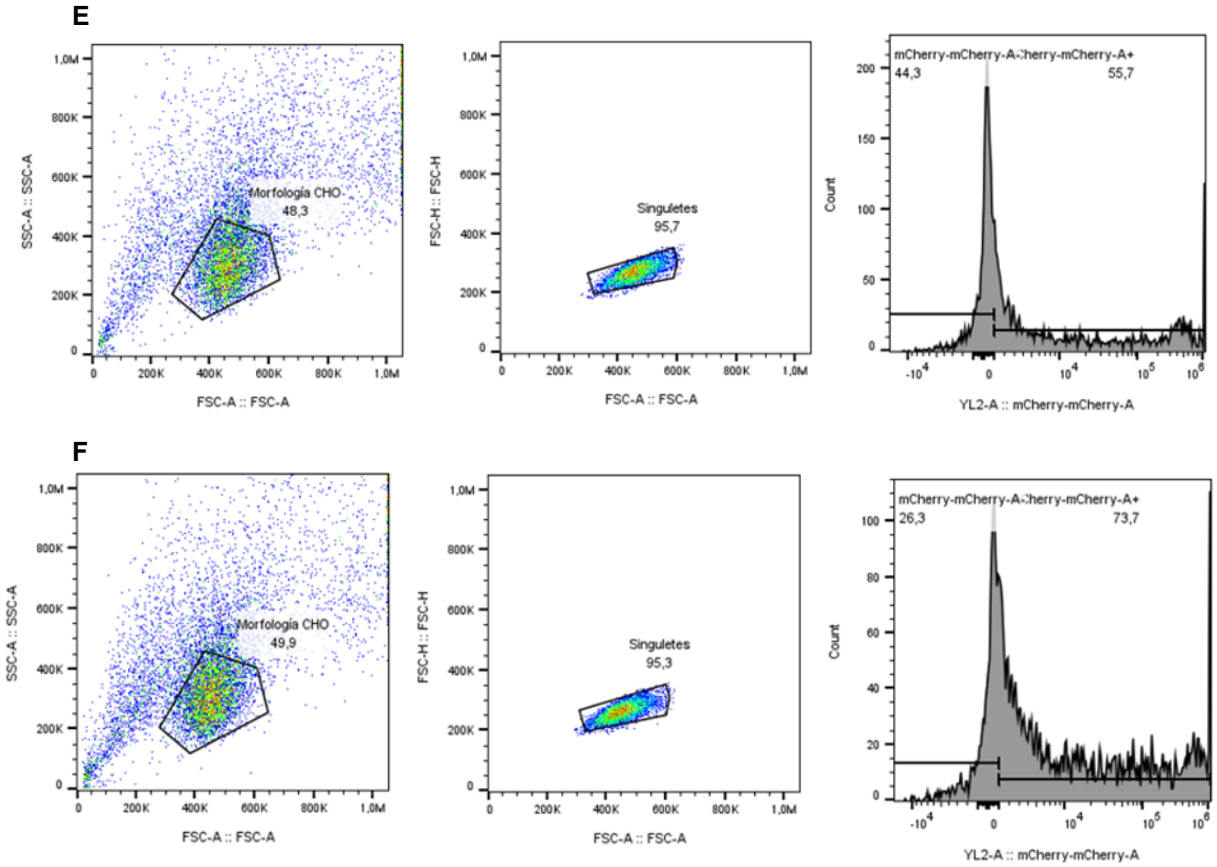


Figura 16. Segunda réplica del estudio del porcentaje de células transfectadas con el fluorocromo mCherry de muestras correspondientes a los mutantes H116A, F210A y F210W. Para cada muestra se determinó la morfología y tamaño de interés de las células CHO a partir del grafico de Side Scatter Area (SSCA) vs Forward Scatter Area (FSCA). Dentro de dicha población se aislaron las células no agregadas, es decir, los singuletes, a partir del grafico de Forward Scatter Area (FSCA) vs Forward Scatter Height (FSCH). Por último, se determinó dentro de esta última población, la cantidad de células transfectadas a partir del histograma que estudia la señal captada por el láser YL2 asociado a mCherry en cada una de las células. Se utilizo como referencia para determinar la población objetivo y el umbral de fluorescencia de mCherry una muestra de células CHO sin transfectar (A). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido control pmCherry (B). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido Tmem176b “wild type” (C). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido Tmem176b mutado con la variante genética H116A (D). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido Tmem176b mutado con la variante genética F210A (E). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido Tmem176b mutado con la variante genética F210W (F).

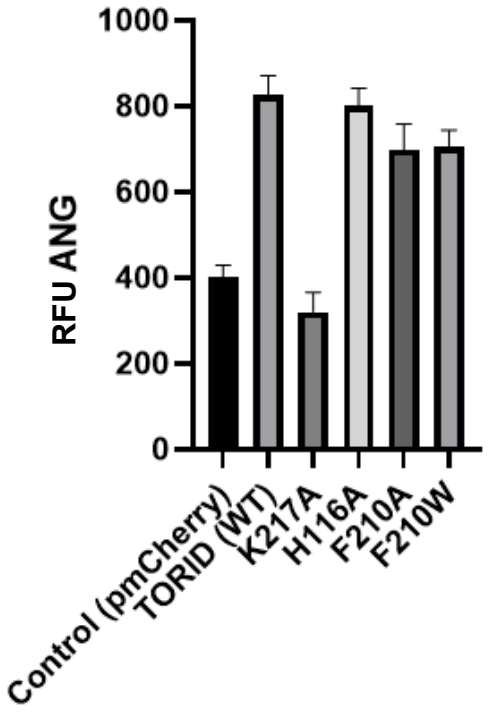
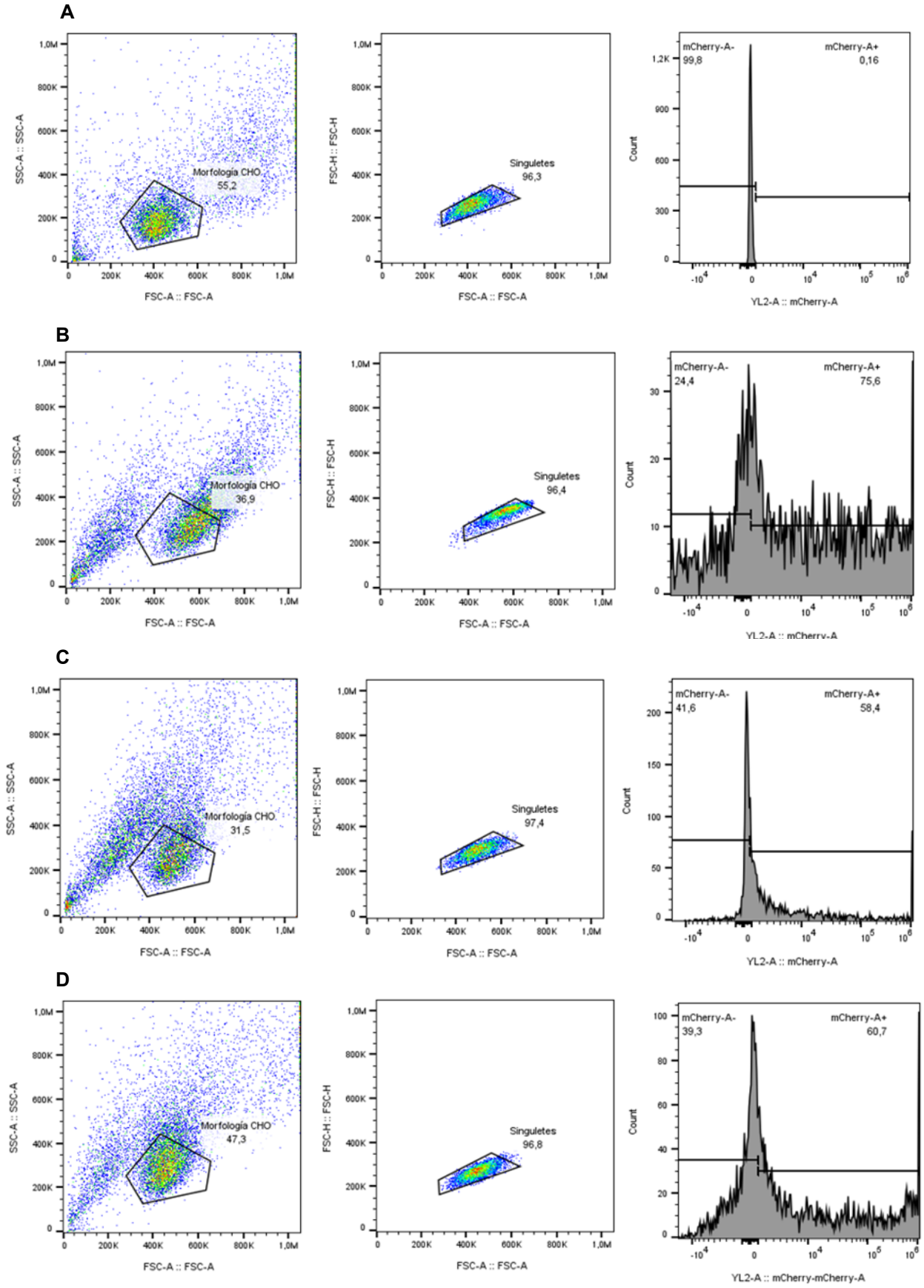


Figura 17. Ensayo de actividad de los mutantes K217A, H116A, F210A y F210W. Se midió la actividad del canal iónico a partir de las unidades relativas de fluorescencia (RFU) de la sonda ANG-2, restando en cada condición el RFU obtenido en medio NMDG (medio libre de Na^+). Los resultados corresponden al promedio de cinco réplicas de medidas de fluorescencia. La sonda fue excitada a 525 nm y se midió la emisión a 545 nm. De izquierda a derecha se presenta: la medida de RFU del control, que determina si existe o no una presunta actividad inhibida o aumentada; la medida de la proteína TORID en su estado nativo, es decir sin ninguna mutación; la medida de la variante genética K217A de TORID; la medida de la actividad de la variante genética H116A; la medida de actividad de la variante F210A; y la medida de actividad de la variante F210W.

Como se mencionó anteriormente, con el objetivo de reafirmar los resultados que se desprenden de las Figuras 10 y 14, se realizó un estudio de medida de la actividad de TORID donde se compararon los mutantes que hipotéticamente serian inocuos, es decir, no afectarían en la actividad del canal, los cuales son H116A, F210A y F210W; junto con la alteración K217A, que surgió como una mutación inactivadora que desencadena en un bloqueo total de la actividad/conductancia iónica del canal.

Observando la Figura 17, se ratifican las tendencias que se mostraban en resultados anteriores, todo apuntaría a que la variante K217A de TORID es responsable de la inhibición total de la actividad del canal iónico; mientras que las demás alteraciones, no parecerían causar un cambio significativo en el funcionamiento del canal iónico.


A
SSC-A :: SSC-A
FSC-A :: FSC-A
Morfología CHO
55,2
FSC-H :: FSC-H
Singuletes
96,3
mCherry-A-
99,8
mCherry-A+
0,16
Count
YL2-A :: mCherry-A
B
Morfología CHO
36,9
Singuletes
96,4
mCherry-A-
24,4
mCherry-A+
75,6
C
Morfología CHO
31,5
Singuletes
97,4
mCherry-A-
41,6
mCherry-A+
58,4
D
Morfología CHO
47,3
Singuletes
96,8
mCherry-A-
39,3
mCherry-A+
60,7
YL2-A :: mCherry-mCherry-A

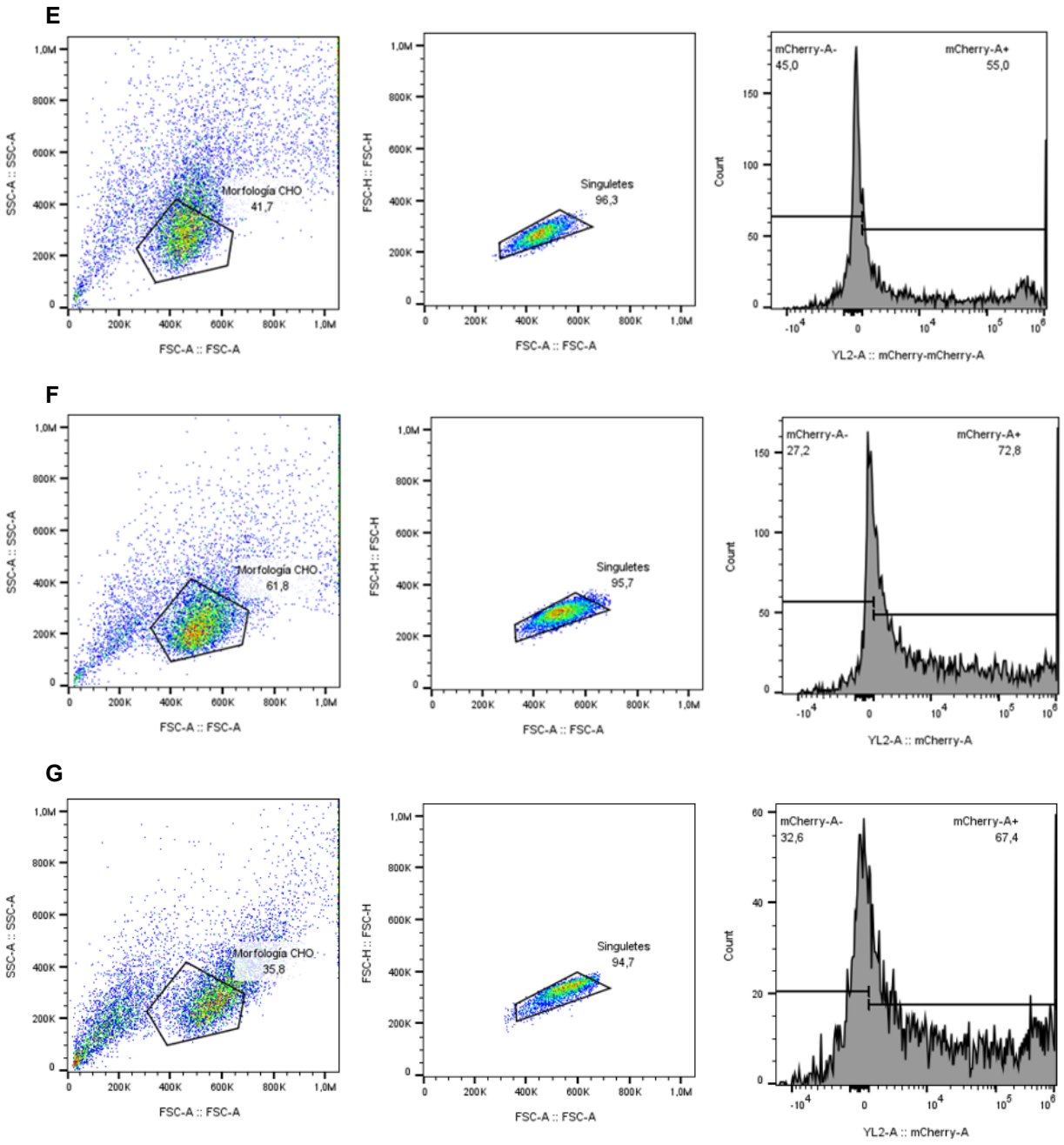


Figura 18. Estudio del porcentaje de células transfectadas con el fluorocromo mCherry de muestras correspondientes a los mutantes K217A, H116A, F210A y F210W. Para cada muestra se determinó la morfología y tamaño de interés de las células CHO a partir del grafico de Side Scatter Area (SSCA) vs Forward Scatter Area (FSCA). Dentro de dicha población se aislaron las células no agregadas, es decir, los singuletes, a partir del grafico de Forward Scatter Area (FSCA) vs Forward Scatter Height (FSCH). Por último, se determinó, dentro de esta última población, la cantidad de células transfectadas a partir del histograma que estudia la señal captada por el láser YL2 asociado a mCherry en cada una de las células. Se utilizo como referencia para determinar la población objetivo y el umbral de fluorescencia de mCherry una muestra de células CHO sin transfectar (A). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido control pmCherry (B). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido

Tmem176b “wild type” (C). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido Tmem176b mutado con la variante genética K217A (D). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido Tmem176b mutado con la variante genética H116A (E). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido Tmem176b mutado con la variante genética F210A (F). Estudio de morfología/tamaño y cuantificación de la señal transfectada de la muestra de células CHO con el plásmido Tmem176b mutado con la variante genética F210W (G).

Siguiendo la misma línea de razonamiento que los demás estudios de señal de mCherry, la Figura 18 muestra la dispersión de porcentajes de transfección para las diferentes muestras de la Figura 17. Podemos apreciar un porcentaje del 58,4% en la muestra TORID “wild type” (Figura 18C), un 60,7% en la variante K217A (Figura 18D), y un 55,0%, 72,8% y 67,4% para las variantes H116A, F210A y F210W respectivamente (Figura 18E, F y G). Se puede ver una tendencia similar en los porcentajes de células con copias del plásmido mCherry. Quizás, el único caso que se aleja de los demás sea la alteración F210A con un 72,8%. A pesar de ello, creemos que, aunque exista la posibilidad de una sobreestimación de la actividad en dicha condición, esto no afectaría de forma significativa la percepción que tenemos de dicha mutación, la cual nace de los resultados previamente expuestos. Presentándose, como una mutación inocua para el funcionamiento del canal, ya sea porque no forma parte del hipotético poro, que pensamos es de vital importancia para la correcta función de TORID, o debido a que, a pesar de formar parte, no afectaría el cambio estudiado en el rol del poro. Este razonamiento se puede transferir a los mutantes H116A y F210W, ya que siguen la misma línea que F210A.

Por otro lado, este último resultado parece confirmar la implicancia que supone el cambio de la lisina de la posición 217 por una alanina, no solo en el poro putativo, sino en el canal. Estamos en condiciones de afirmar que el mutante K217A es responsable de una inhibición total del canal iónico. Se podría proponer a la lisina 217 como un potencial blanco farmacológico (siguiendo las líneas del diseño racional de fármacos) para inhibir TORID y de esta forma generar una activación del inflamasoma NLRP3, con todo lo que esto significa para las inmunoterapias tumorales.

Para confirmar los resultados obtenidos, seria optimo evaluar la expresión de la proteina Tmem176b en la condición “wild type” y mutada para asegurar que se estén expresando de la misma manera a partir de un ensayo de Western Blot.

4.3. Puesta a punto de un modelo terapéutico de cáncer en murinos

Se inyectaron ratones con células tumorales MC38. La línea celular MC38 es una línea murina de cáncer colorrectal. Para escoger la cantidad de células optima a inyectar para un crecimiento tumoral satisfactorio se eligió la condición que generaba el tumor a partir de la menor cantidad de células.

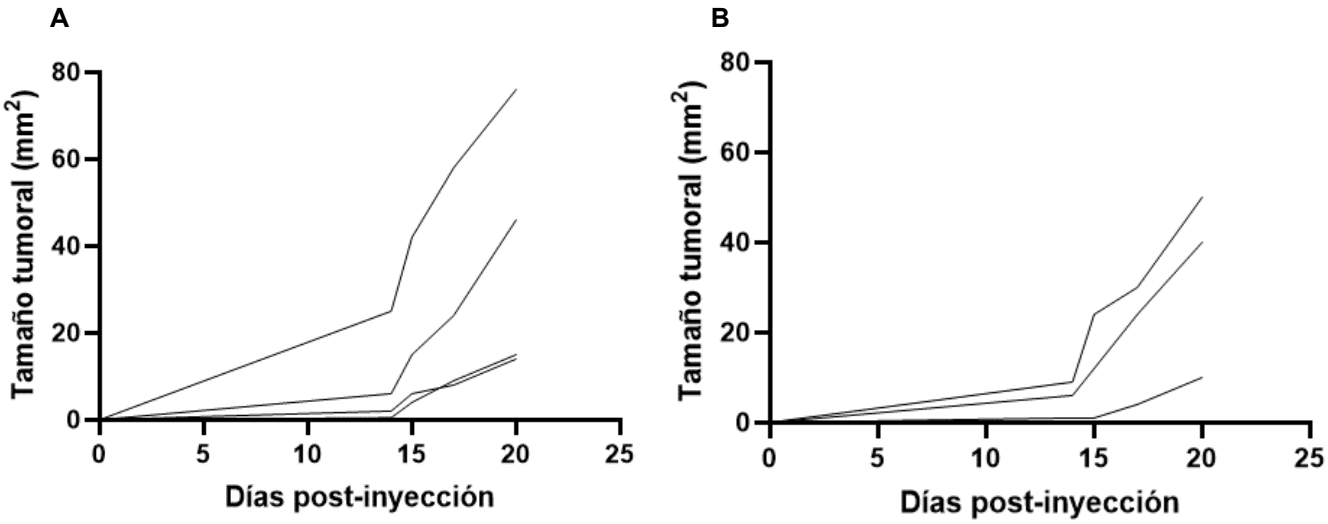


Figura 19. Desarrollo tumoral en ratones. Se inyectaron a cinco ratones con 1,0e6 o 2,0e6 células MC38 vía subcutánea. Encontramos un mayor crecimiento tumoral en los ratones inyectados con 1,0e6 células (A) comparado con los inyectados con 2,0e6 células (B) en un menor tiempo.

Para cada una de las condiciones analizadas en la Figura 19, se estudió una población de cinco ratones cada una. En cuanto a la condición de 1,0e6 células MC38 inyectadas (Figura 19A), un ratón no desarrollo tumor palpable manualmente. Mientras que, en la condición de 2,0e6 células inyectadas (Figura 19B), un total de dos ratones no experimentaron desarrollo tumoral apreciable.

Los resultados indican que se produce un desarrollo tumoral a partir de la inyección de la cantidad menor de células estudiadas, ósea de 1,0e6 células, además de que se produce en un menor tiempo con respecto a la otra condición. Esto significaría que, si se buscara trabajar en un modelo de cáncer colorrectal murino, seria favorable optar por una inyección de 1,0e6 células MC38, en lugar de 2,0e6 células.

De todas formas, seria óptimo para tomar una decisión definitiva el estudio de cantidades inferiores de células inyectadas, puesto que, existe la posibilidad de que se pueda generar un tumor con una inyección aún menor en un tiempo acorde.

5. Conclusiones y Perspectivas

Los resultados obtenidos sugieren que mutaciones en ciertos residuos aminoacídicos de TORID podrían desencadenar una inhibición, ya sea, parcial como en el caso de la variante Q71A; completa, como en las alteraciones A128T/A134T (dependiendo el modelo) y K217A, o nula como las mutaciones H116A, F210A y F210W.

Casi todos estos residuos aminoacídicos fueron seleccionados mediante la teoría de que forman parte de la estructura de un hipotético poro en el canal, el cual se cree es blanco de la molécula inhibidora BayK8644, y que fue descubierto a partir de modelados de biología estructural. Dicha estructura se hipotetiza juega un papel fundamental para la correcta actividad de la proteína.

Por otra parte, el aminoácido A128/A134 de TORID fue seleccionado debido a su correlación con un polimorfismo SNP que afecta a gran parte de la población y se asocia con una mayor sobrevida de pacientes con cáncer colorrectal (1). Se confirmo la hipótesis que se manejaba que dicha alteración era una “loss of function” o mutación inactivadora la cual es responsable del bloqueo total de la actividad del canal iónico. Esta información es relevante para poder interpretar que pacientes podrían beneficiarse y cuales no, de la inhibición farmacológica de Tmem176b. En otras palabras, los pacientes con la variante inactivada, codificada por el polimorfismo, no deberían beneficiarse del tratamiento con inhibidores de TORID.

En cuanto a los resultados derivados de la lisina 217 (K217), este surge como un potencial blanco farmacológico para la inhibición de Tmem176b, pudiendo desencadenar la activación del inflamasoma NLRP3.

Al conocer mas acerca de la composición de este poro, podrían emerger nuevas generaciones de fármacos derivados de BayK8644, a partir de estrategias de diseño racional de drogas, que tengan como dianas a los aminoácidos que componen el poro de TORID. Estos descubrimientos son prometedores para continuar entendiendo como mejorar inhibidores y como entender los mecanismos moleculares del manejo de iones de este canal, problemáticas claves a abordar para el proceso de diseño racional de fármacos basados en conocimiento estructural de Tmem176b.

Por otra parte, este trabajo propuso la puesta a punto de un modelo terapéutico de cáncer colorrectal en murinos. El correcto desarrollo de esto es esencial para poder estudiar la respuesta inmune hacia el tratamiento con drogas ya existentes o nuevas generaciones de dichos fármacos. Particularmente se buscó comenzar a poner a punto un modelo murino de cáncer de colon para en un futuro estudiar un abanico de moléculas sintetizadas artificialmente a partir de BayK8644, que se hipotetiza, podrían tener un efecto similar o mejor a la hora de tratar las diferentes progresiones de este tipo de cáncer mediante la inhibición de Tmem176b.

Encontramos que la inyección de 1,0e6 células MC38 deriva en una formación tumoral satisfactoria en ratones. Estas pruebas abren un nuevo panorama a la hora de evaluar nuevas inmunoterapias oncológicas en un modelo animal.

En conclusión, nuestros resultados muestran que existen residuos aminoacídicos claves en el canal iónico, que, al ser sustituidos o bloqueados, desencadenan en una modulación inhibitoria de la actividad de TORID. Esto abre como perspectiva la utilización de estos aminoácidos como potenciales blancos de fármacos inhibidores de TORID como nuevas terapias antitumorales. Estas terapias deberían evaluarse en modelos murinos optimizados para el estudio de la progresión tumoral.

Referencias bibliográficas

1. Cambui RAG, Fernandes FP, Leal VNC, Reis EC, De Lima DS, Do Espírito Santo GF, et al. The Ala134Thr variant in TMEM176B exerts a beneficial role in colorectal cancer prognosis by increasing NLRP3 inflammasome activation. J Cancer Res Clin Oncol. 2023;149(7):3729-38.

2. Finn OJ. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. Ann Oncol. 2012;23:viii6-9.

3. Chow MT, Möller A, Smyth MJ. Inflammation and immune surveillance in cancer. Semin Cancer Biol. 2012;22(1):23-32.

4. Berraondo P, Minute L, Ajona D, Corrales L, Melero I, Pio R. Innate immune mediators in cancer: between defense and resistance. Immunol Rev. 2016;274(1):290-306.

5. Hill M, Segovia M, Russo S, Girotti MR, Rabinovich GA. The Paradoxical Roles of Inflammation during PD-1 Blockade in Cancer. Trends Immunol. 2020;41(11):982-93.

6. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, et al. Demonstration of an interferon γ-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. Proc Natl Acad Sci. 1998;95(13):7556-61.

7. Bolitho P, Street SEA, Westwood JA, Edelmann W, MacGregor D, Waring P, et al. Perforin-mediated suppression of B-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci. 2009;106(8):2723-8.

8. Street SEA, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-γ activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. Blood. 2001;97(1):192-7.

9. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol. 2002;3(11):991-8.

10. Velázquez PMJ, López JGH, Quintana PC. Interacciones entre el cáncer y el sistema inmunológico. 2017;26.

11. Browning MJ, F. Bodmer W. MHC antigens and cancer: implications for T-cell surveillance. Curr Opin Immunol.1992;4(5):613-8.

12. Reed JC. Mechanisms of Apoptosis. Am J Pathol. 2000;157(5):1415-30.

13. Benbaruch A. Inflammation-associated immune suppression in cancer: The roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. Semin Cancer Biol. 2006;16(1):38-52.

14. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer. J Immunol. 2009;182(8):4499-506.

15. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2004;4(1):11-22.

16. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. 2011;144(5):646-74.

17. Kenter GG, Welters MJP, Valentijn ARPM, Lowik MJG, Berends-van Der Meer DMA, Vloon APG, et al. Vaccination against HPV-16 Oncoproteins for Vulvar Intraepithelial Neoplasia. N Engl J Med. 2009;361(19):1838-47.

18. Bremers AJA, Parmiani G. Immunology and immunotherapy of human cancer: present concepts and clinical developments. Crit Rev Oncol Hematol. 2000;34(1):1-25.

19. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer–immune set point. Nature. 2017;541(7637):321-30.

20. Finn OJ. Cancer Immunology. N Engl J Med. 2008;358(25):2704-15.

21. Balachandran VP, Cavnar MJ, Zeng S, Bamboat ZM, Ocuin LM, Obaid H, et al. Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido. Nat Med. 2011;17(9):1094-100.

22. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. Cell. 2010;140(6):883-99.

23. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature. 2008;454(7203):428-35.

24. Swann JB, Vesely MD, Silva A, Sharkey J, Akira S, Schreiber RD, et al. Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci. 2008;105(2):652-6.

25. Mattarollo SR, Loi S, Duret H, Ma Y, Zitvogel L, Smyth MJ. Pivotal Role of Innate and Adaptive Immunity in Anthracycline Chemotherapy of Established Tumors. Cancer Res. 2011;71(14):4809-20.

26. Montaño E, Fortoul V, Rendón H. ¿Qué son los inflamasomas? El NLRP3 como ejemplo. Rev Fac Med UNAM. 2017;60(1):42-9.

27. Liu Y, Zeng G. Cancer and Innate Immune System Interactions: Translational Potentials for Cancer Immunotherapy. J Immunother. 2012;35(4):299-308.

28. Dostert C, Ludigs K, Guarda G. Innate and adaptive effects of inflammasomes on T cell responses. Curr Opin Immunol. 2013;25(3):359-65.

29. Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. Nat Immunol. 2012;13(4):343-51.

30. Mellor AL, Munn DH. Physiologic Control of the Functional Status of Foxp3+ Regulatory T Cells. J Immunol. 2011;186(8):4535-40.

31. Louvet C, Chiffoleau E, Heslan M, Tesson L, Heslan J, Brion R, et al. Identification of a New Member of the CD20/FcεRIβ Family Overexpressed in Tolerated Allografts. Am J Transplant. 2005;5(9):2143-53.

32. Zuccolo J, Bau J, Childs SJ, Goss GG, Sensen CW, Deans JP. Phylogenetic Analysis of the MS4A and TMEM176 Gene Families. Fugmann SD, editor. PLoS ONE. 2010;5(2):e9369.

33. Eon Kuek L, Leffler M, Mackay GA, Hulett MD. The MS4A family: counting past 1, 2 and 3. Immunol Cell Biol. 2016;94(1):11-23.

34. Condamine T, Le Texier L, Howie D, Lavault A, Hill M, Halary F, et al. Tmem176b and Tmem176a are associated with the immature state of dendritic cells. J Leukoc Biol. 2010;88(3):507-15.

35. Segovia M, Louvet C, Charnet P, Savina A, Tilly G, Gautreau L, et al. Autologous Dendritic Cells Prolong Allograft Survival Through Tmem176b-Dependent Antigen Cross-Presentation. Am J Transplant. 2014;14(5):1021-31.

36. Wang Y, Han KJ, Pang XW, Vaughan HA, Qu W, Dong XY, et al. Large Scale Identification of Human Hepatocellular Carcinoma-Associated Antigens by Autoantibodies. J Immunol. 2002;169(2):1102-9.

37. Cuajungco MP, Podevin W, Valluri VK, Bui Q, Nguyen VH, Taylor K. Abnormal accumulation of human transmembrane (TMEM)-176A and 176B proteins is associated with cancer pathology. Acta Histochem. 2012;114(7):705-12.

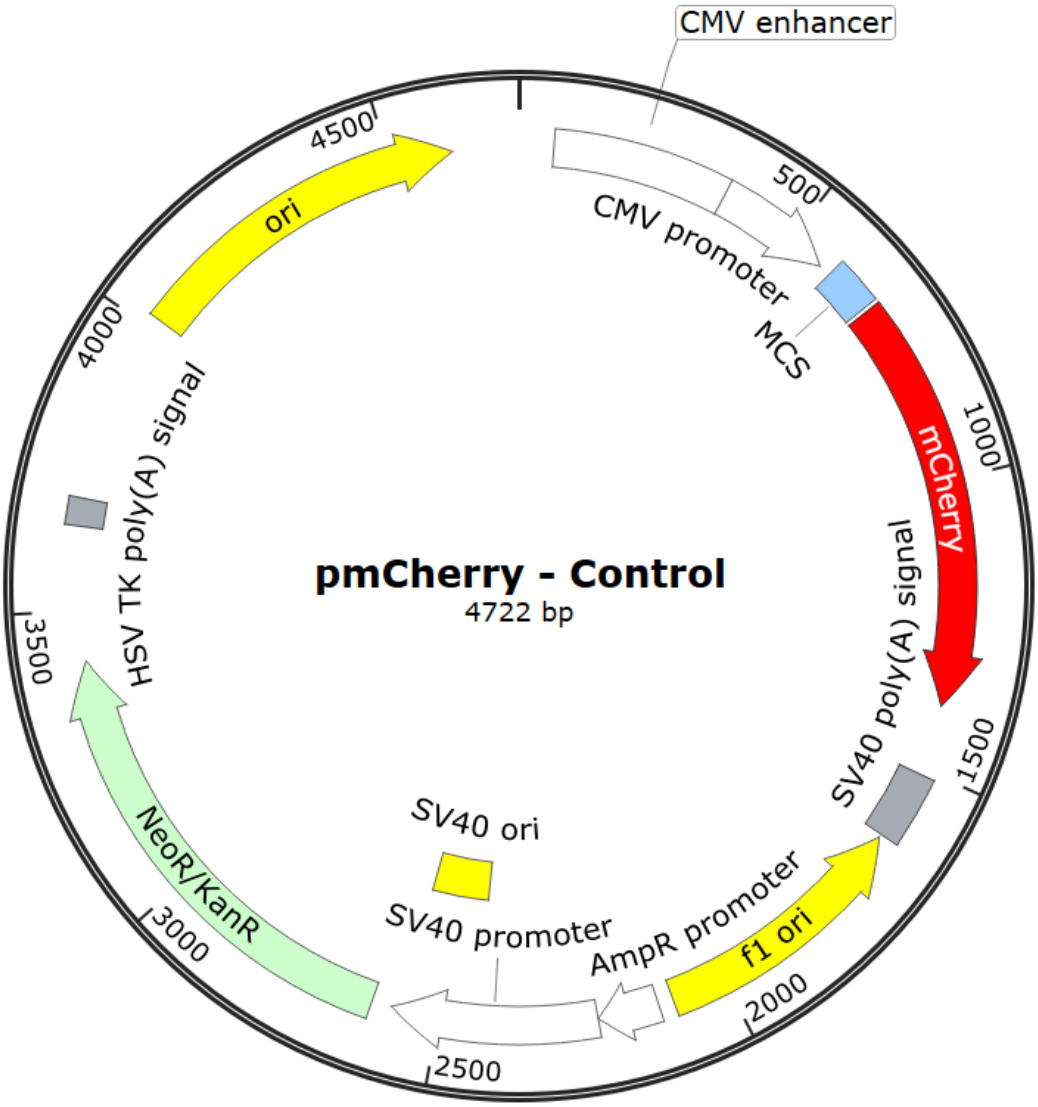
38. Otsubo T, Hida Y, Ohga N, Sato H, Kai T, Matsuki Y, et al. Identification of novel targets for antiangiogenic therapy by comparing the gene expressions of tumor and normal endothelial cells. Cancer Sci. 2014;105(5):560-7.

39. Sun L, Zhang Y, Zhang C. Distinct Expression and Prognostic Value of MS4A in Gastric Cancer. Open Med Wars Pol. 2018;13:178-88.

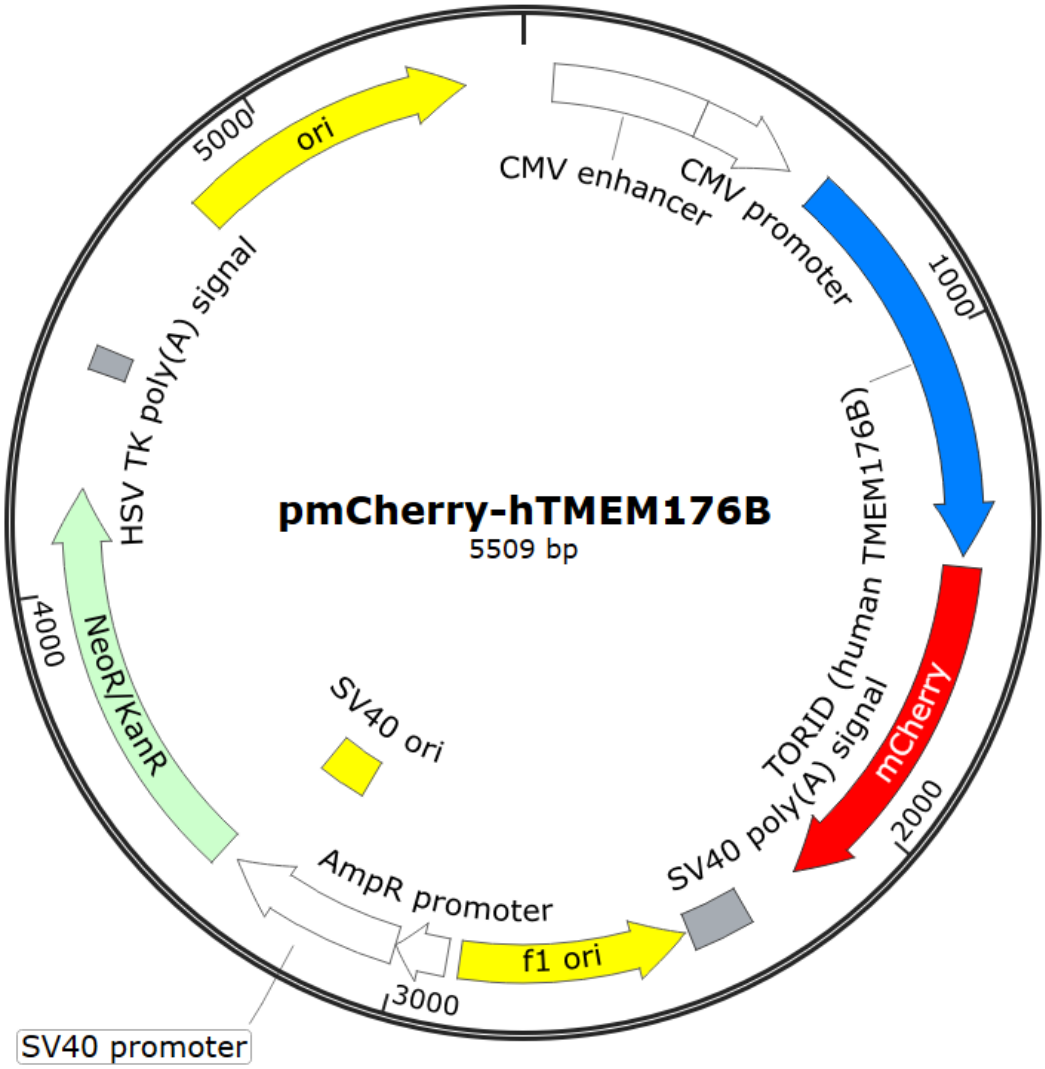
40. Gong T, Yang Y, Jin T, Jiang W, Zhou R. Orchestration of NLRP3 Inflammasome Activation by Ion Fluxes. Trends Immunol. 2018;39(5):393-406.

41. Segovia M, Russo S, Jeldres M, Mahmoud YD, Perez V, Duhalde M, et al. Targeting TMEM176B Enhances Antitumor Immunity and Augments the Efficacy of Immune Checkpoint Blockers by Unleashing Inflammasome Activation. Cancer Cell. 2019;35(5):767-781.e6.

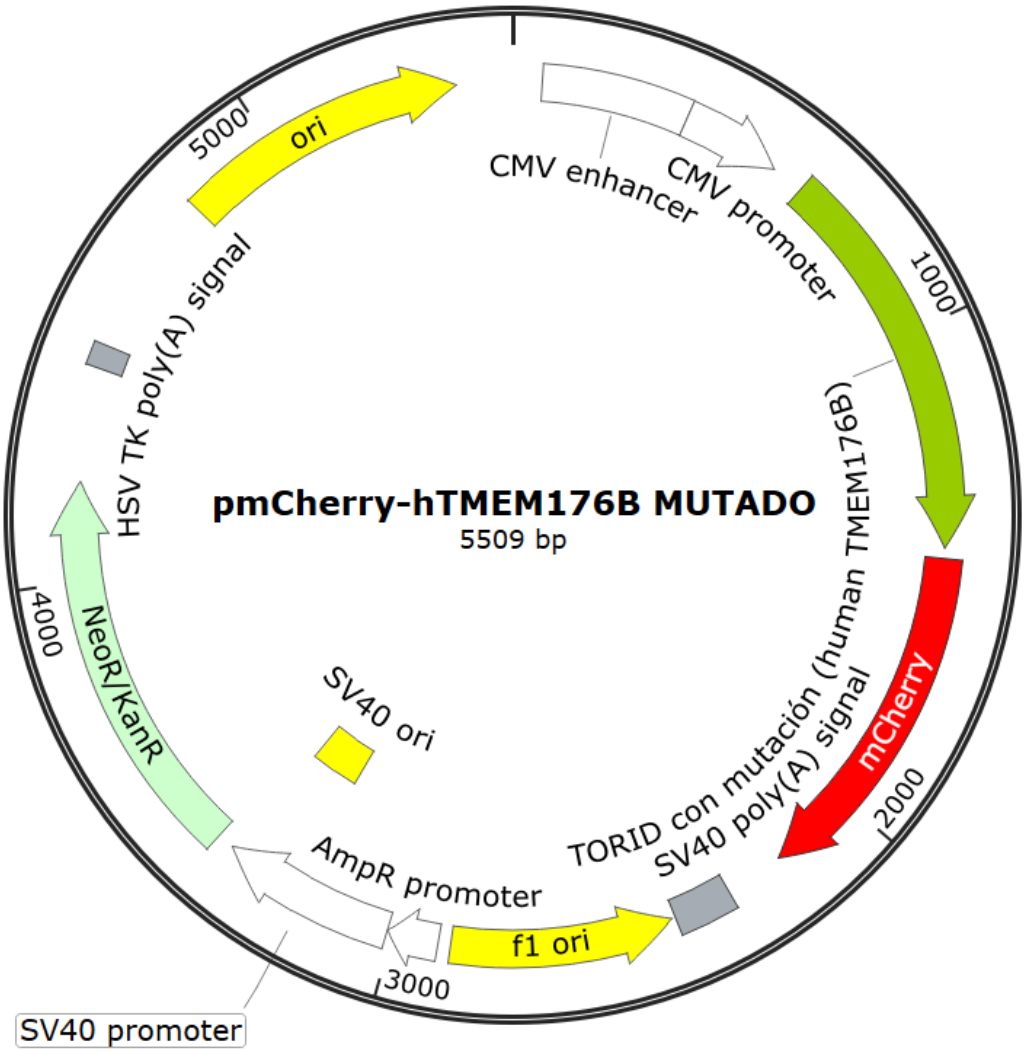
Anexos



Anexo 1. Plásmido control pmCherry-N1. Creado con SnapGene.



Anexo 2. Plásmido pmCherry-N1 con la secuencia de TORID en estado nativo (“wild type”). Creado con SnapGene.



Anexo 3. Plásmido pmCherry-N1 con la secuencia de TORID mutada, dependiendo la alteración, A128T, Q71A, K217A, H116A, F210A o F210W. Creado con SnapGene