



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
POSGRADO EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

Idónea Comunicación de Resultados

**EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE CTLA-4 EN LÍNEAS CELULARES DE
MELANOMA Y MELANOCITOS**

Proyecto de investigación

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS NATURALES
E INGENIERÍA

PRESENTA

BIO. MOL. MARYSOL BELLO GONZALEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. CLAUDIA HAYDÉE GONZÁLEZ DE LA ROSA

ASESORES

DRA. ELENA ARÉCHAGA OCAMPO

DR. JUAN CARLOS RODRÍGUEZ ALBA

ÍNDICE

ABREVIATURAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	12
RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	14
MELANOMA	14
TERAPIA DIRIGIDA E INMUNOTERAPIA EN MELANOMA.....	15
CTLA-4 EN EL SISTEMA INMUNE	16
ESTRUCTURA DE CTLA-4.....	19
CTLA-4 EN OTROS LINAJES CELULARES, ENFERMEDADES AUTOINMUNES Y EN NEOPLASIAS	21
ANTECEDENTES DEL TRABAJO	25
JUSTIFICACIÓN.....	26
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	26
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
RESULTADOS	36
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIÓN	46
PERSPECTIVAS.....	46
REFERENCIAS.....	47
APÉNDICE	58

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa, bajo la dirección de la Dra. Claudia Haydée González de la Rosa, y asesorado por la Dra. Elena Aréchaga Ocampo y el Dr. Juan Carlos Rodríguez Alba.

Durante el periodo en el que se cursó la Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería, la **Bio. Mol. Marysol Bello Gonzalez**, con número de matrícula 2193800816, recibió los apoyos que se describen a continuación:

- Beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) en el periodo de diciembre del 2019 al diciembre del 2021. Número de becaria: 763438.
- Apoyo económico por parte del Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería (PCNI) para la realización de una estancia académica en la Unidad de Citometría de Flujo del Instituto de Ciencias de la Salud, en la Universidad Veracruzana, la cual abarcó un periodo desde el 28 de noviembre al 5 de diciembre del 2021.
- Apoyo extraordinario otorgado por la Universidad Autónoma Metropolitana para concluir la Idónea Comunicación de Resultados (ICR).
- Apoyo económico y becas para la realización de actividades extracurriculares otorgados por el PCNI y la Universidad Autónoma Metropolitana.

A todos los actores mencionados, se les otorga un pleno agradecimiento.

Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Especialización del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa. El trabajo experimental fue realizado de diciembre del 2019 al diciembre del 2021 en el Laboratorio de Biología Celular de la DCNI y en la Unidad de Citometría de Flujo del Instituto de Ciencias de la Salud, en la Universidad Veracruzana, estancia que abarcó un periodo del 28 de noviembre al 5 de diciembre del 2021.

DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 21 del mes de julio del año 2022, la que suscribe **Bio. Mol. Marysol Bello Gonzalez**, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autora intelectual de la presente idónea comunicación de resultados intitulada “**Expresión y función de CTLA-4 en líneas celulares de melanoma y melanocitos**”, realizada bajo la dirección de la **Dra. Claudia Haydée González de la Rosa**, y cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso la directora del trabajo como representante de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: cgonzalez@cua.uam.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Marysol Bello Gonzalez

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“La que suscribe, **Bio. Mol. Marysol Bello Gonzalez**, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería, declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otras (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que este fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi director y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”

A handwritten signature in black ink, consisting of the letters 'M' and 'B' intertwined within a circular shape, with a small flourish below.

Marysol Bello Gonzalez

DECLARACIÓN DE NO LUCRO:

La que suscribe, **Bio. Mol. Marysol Bello Gonzalez**, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM).

A handwritten signature in black ink, consisting of the letters 'MB' inside a circle with a flourish underneath.

Marysol Bello Gonzalez

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de ICR

Dra. Claudia Haydée González de la Rosa

Por haberme dado la oportunidad, no solo de realizar un proyecto de maestría bajo su dirección, si no por también otorgarme herramientas, conocimientos, tiempo y lecciones para crecer como profesionalista y persona.

A mis asesores

Dra. Elena Aréchaga Ocampo

Dr. Juan Carlos Rodríguez Alba

Por sus valiosas enseñanzas, tiempo y retroalimentación invertidos en la realización del proyecto y fuera de este.

DEDICATORIAS

Al Universo

Por poner en mi camino a todas las personas y situaciones que me han permitido llegar hasta donde estoy y por conspirar para que las cosas sucedan, no a mi manera, si no a la que consideras más convenientes.

A mi mamá

Por tu amor, apoyo incondicional, comprensión y enseñanzas de vida. Sin ti no sería lo que soy.

A Patricio y a su familia

Por todo el amor y apoyo incondicional que me han brindado en las buenas, en las malas y en esas.

A mi familia

Por inspirarme a dar siempre más de mí y por brindarme su apoyo en diversas situaciones

A mis amigas y amigos

Por su lealtad, apoyo y confianza, a pesar de los años y la distancia.

A mis profesoras y profesores

Por abrirme las puertas al conocimiento y por sus enseñanzas invaluable.

A la UAM-Cuajimalpa y a sus integrantes

Por ser mi segunda casa, una casa abierta al tiempo

ABREVIATURAS

ADCC	<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
APC	<i>Antigen presenting cells</i>
AP-1	<i>Adaptor activating protein 1 y 2</i>
AP-2	
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CD28	Clúster de diferenciación 28
CD80, B7-1	Clúster de diferenciación 80
CD86, B7-2	Clúster de diferenciación 86
CTLA-4, CD152	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i> , clúster de diferenciación 152
DCs	<i>Dendritic cells</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
EVs	<i>Extracellular vesicles</i>
FOXP3	<i>Forkhead box protein P3</i>
HSP	<i>Heat shock proteins</i>
IL	Interleucina
IFN- γ	<i>Interferon gamma</i>
JAK	<i>Janus tyrosine kinase</i>
LAG-3	<i>Lymphocyte-activation gene 3</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
miRNAs	MicroRNAs

mRNA	<i>Ribonucleic acid</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed Death-ligand 1</i>
PD-L2	<i>Programmed Death-ligand 2</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PMBCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
POLII	<i>RNA polymerase II</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
STAT1	<i>Signal Transducer And Activator Of Transcription 1</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TIM-3	<i>T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TME	<i>Tumor microenvironment</i>
SI	<i>Sinapsis Inmunológica</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS	Página
Figura 1. Mecanismo de activación y desactivación de los linfocitos T.	17
Figura 2. Motivos citoplasmáticos involucrados en la localización y el transporte celular de CTLA-4.	18
Figura 3. Estructura del gen de CTLA-4 y del ARNm de las isoformas derivadas de <i>splicing</i> alternativo.	20
Figura 4. Análisis de RT-PCR de los transcritos de CTLA-4 en líneas celulares de melanoma y melanocitos.	36
Figura 5. Detección CTLA-4 mediante <i>Western blot</i> en las líneas celulares de melanoma y melanocitos.	37
Figura 6. Perfiles de expresión intracelular de CTLA-4 en líneas celulares de melanoma y melanocitos obtenidos mediante citometría de flujo.	38
Figura 7. Cuantificación del porcentaje de viabilidad celular de A-375 en frente al bloqueo de CTLA-4.	39
Figura 8. Estandarización del ensayo de apoptosis con Anexina V/7AAD en células A-375.	40

APÉNDICE

Figura 9. IFN- γ provoca el aumento de la expresión de CTLA-4 en A-375.	60
--	----

RESUMEN

La detección temprana del melanoma maligno permite tratamientos quirúrgicos curativos, pero en estadios avanzados por metástasis, la opción terapéutica es la inmunoterapia. Uno de los blancos moleculares a donde se puede dirigir la inmunoterapia es CTLA-4 (antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos), el cual es considerado el primer *checkpoint* inmunológico funcional. No obstante, se ha reportado que CTLA-4 se expresa en diversas neoplasias, incluyendo al melanoma, donde la expresión de CTLA-4 se ha relacionado con un mal pronóstico de la enfermedad, pero poco se sabe de su papel en estos tipos celulares. Por ello, nos planteamos caracterizar la expresión de CTLA-4 en células melanocíticas (HEMa) y de melanoma (A-375 y SK-MEL-31).

De acuerdo con lo anterior, se detectó la expresión de CTLA-4 a través de RT-PCR y *Western blot*, y se determinó su localización mediante citometría de flujo. Además, en ensayos de viabilidad celular en la línea celular de A-375, la previa estimulación con IFN- γ influyó en la expresión de CTLA-4 y su bloqueo provocó una disminución en la viabilidad celular. Estudiar la función de CTLA-4 en melanoma resulta atractivo para entender los mecanismos de progresión y supervivencia en el desarrollo del melanoma, lo cual podría promover nuevas perspectivas en lo que se refiere a su detección, tratamiento y pronóstico.

INTRODUCCIÓN

MELANOMA

De los diferentes tipos de cáncer de piel, el melanoma maligno es el tercero más frecuente en México, con una tasa de incidencia de 1/100,000 habitantes. Su detección temprana permite tratamientos curativos; sin embargo, la estadificación de la enfermedad puede ser un reto debido a limitaciones técnicas (Gallegos, Gallegos y Nieweg, 2014).

El melanoma maligno es una neoplasia que tiene origen en los melanocitos. Los melanocitos se desarrollan a partir de células de la cresta neural llamadas melanoblastos, los cuales se ubican generalmente en la epidermis, cabello e iris. Su función es la síntesis y transporte de melanina¹ a los queratinocitos en orgánulos llamados melanosomas, para así protegerlos del efecto mutagénico causado por la radiación UV, la cual es el principal factor de riesgo para desarrollar melanoma maligno (Cichorek, Wachulska, Stasiewicz y Tymińska, 2013). Otros factores de riesgo importantes incluyen la historia personal y familiar con respecto al melanoma o la presencia de nevos y pecas atípicas. Comúnmente, el diagnóstico del melanoma se realiza a través de estudios histopatológicos (Leonardi et al., 2018).

El melanoma en etapas avanzadas suele ser mortal, debido a su rápida capacidad metastásica y su resistencia frente a quimioterapia y radioterapia. Se estima que 10,000 personas fallecen anualmente debido a que en 80% de los casos se encuentra en un estadio avanzado (Egner, 2010; Gallegos, Gallegos y Nieweg, 2014).

¹ Pigmento que tiene diversas propiedades, como la absorción y dispersión de luz UV, eliminación de radicales libres, reacciones de óxido-reducción acopladas y almacenamiento de iones (Cichorek, Wachulska, Stasiewicz y Tymińska, 2013).

En este contexto, se han realizado investigaciones que pretenden dilucidar la biología tumoral del melanoma, para así ampliar terapéuticas, lo que podría mejorar el pronóstico.

TERAPIA DIRIGIDA E INMUNOTERAPIA EN MELANOMA

Una de las terapias utilizadas para su tratamiento en etapas avanzadas es la terapia dirigida, la cual consiste en el empleo de moléculas pequeñas que van dirigidas a bloquear proteínas clave involucradas en vías de crecimiento celular, en proliferación y en invasión. Algunos de estos fármacos aprobados son el vemurafenib y trametinib, ambos inhibidores de cinasas, específicamente dirigidos a melanoma con mutaciones en BRAF y MEK, respectivamente, las cuales están involucradas en el desarrollo y progresión de la enfermedad (Robert, et al., 2015).

En 2011, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) autorizó el uso de ipilimumab en pacientes con melanoma avanzado. Este fármaco es un anticuerpo que inhibe al antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4, CD152) (Ledford, 2011). CTLA-4 es considerado el primer *checkpoint* inmunológico funcional (Gu et al., 2018). A lo largo del tiempo, el uso de ipilimumab en combinación con otros, como pembrolizumab o nivolumab, ambos inhibidores de la proteína de muerte celular programada (PD-1), se ha asociado con un incremento de la respuesta inmunológica antitumoral propia del paciente (Wolchok et al., 2017).

Sin embargo, aunque con esta terapia se ha demostrado una mejoría en la supervivencia global de los pacientes, solo una minoría logra una respuesta duradera, lo que evidencia la necesidad de caracterizar la función de los *checkpoints* inmunológicos presentes en el microambiente tumoral (TME). Para ahondar más en la actividad de CTLA-4 como “freno” de la respuesta

inmune, se describirá brevemente la activación e inactivación de los linfocitos T.

CTLA-4 EN EL SISTEMA INMUNE

CTLA-4 es un co-receptor inhibitorio perteneciente a la superfamilia de inmunoglobulinas. Al igual que CD28, el gen *CTLA-4* se localiza en el cromosoma 2q33-34 y suele expresarse en células T CD8⁺ y CD4⁺ de manera inducida, y de forma constitutiva en el caso de las células T reguladoras (Tregs) (Vaidya, B., & Pearce, S., 2004).

CTLA-4 induce señales en los linfocitos T activados cuando se une a sus ligandos CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2), ambos expresados por las células presentadoras de antígeno (APC), mediante la inhibición de la producción de ciclina D3 y cinasas dependientes de ciclina, impidiendo la progresión del ciclo celular y la producción de citocinas, como IL-2, IL-4 e IFN- γ (Figura 1A) (Greenwald et al., 2002).

Por el contrario, cuando ocurre una inhibición de CTLA-4 por el anticuerpo ipilimumab, se retira el freno inmunológico, lo que lleva a la activación de los linfocitos T, quienes al unirse a las APC crean la sinapsis inmunológica (SI) vía complejo péptido/MHC-TCR y CD80/CD86/CD28 (Figura 1B). Esta unión induce la expresión de más proteínas en la membrana celular que tienen como objetivo reforzar el contacto entre ambas células y transmitir señales de activación (Contardi et al., 2005). Este fenómeno se ha categorizado como parte de los mecanismos extrínsecos de CTLA-4.

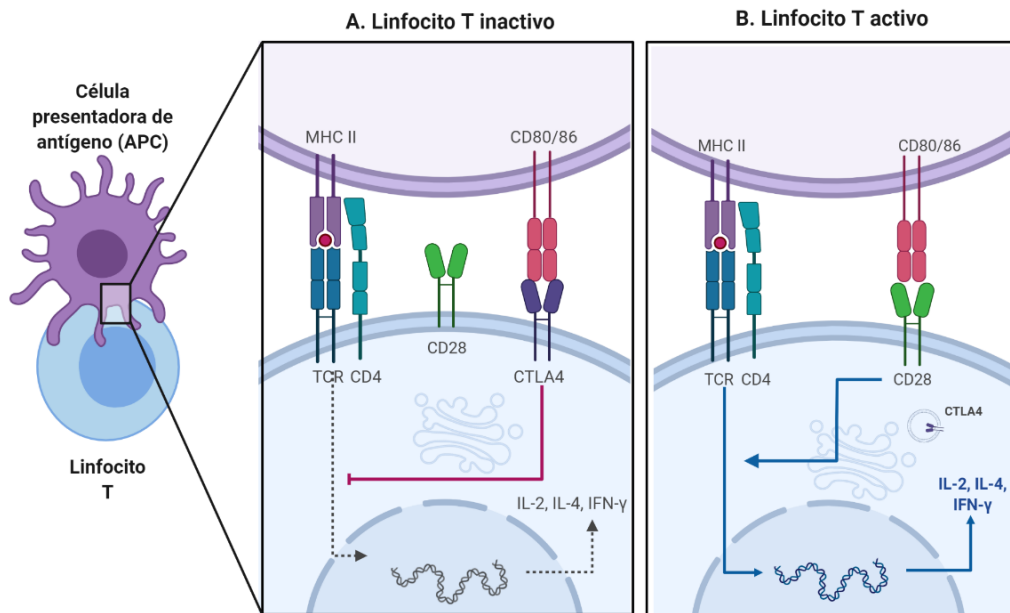


Figura 1. Mecanismo de inactivación y activación de los linfocitos T. **A)** CTLA-4 compete con la proteína activadora de los linfocitos T, denominada CD28, inhibiendo así la producción de citocinas, como IL-2, IL-4, así como el IFN- γ y la progresión del ciclo celular. **B)** Cuando el linfocito T se encuentra activo, CTLA-4 suele estar en la red del trans-Golgi o en endosomas, en donde puede ser reciclado (Schneider, H., & Rudd, C. E., 2014). Imagen creada en BioRender.com

Cabe mencionar que CTLA-4 presenta una homología del 30% con la secuencia de CD28. En ambos receptores se encuentra el motivo de unión MYPPPY; no obstante, CTLA-4 presenta mayor afinidad por CD80 debido a que un homodímero de CTLA-4 puede interactuar con dos moléculas de CD80, resultando en la formación de una estructura estable de CTLA-4/CD80 durante la SI (Schneider y Rudd, 2014).

Respecto a los mecanismos intrínsecos, para que CTLA-4 se retenga en la superficie celular, es necesaria la fosforilación del residuo de tirosina Y₂₀₁, dados por Lck y Fyn. A su vez, esta fosforilación recluta a fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) y a SHP-2, la cual se encarga de desfosforilar a CTLA-4 (Figura 2). Una vez desfosforilada, CTLA-4 se une a AP-2 a través del motivo YVKM y se internaliza en compartimientos intracelulares, ya sean para reciclaje endosomal o degradación por lisosomas (Qureshi et al., 2012). Sin embargo,

un estudio demostró que la proteína LRBA (proteína de ancla tipo *beige* y sensible a polisacáridos) compite con AP-1 por la unión al motivo YVKM y evita que CTLA-4 sea degradado en lisosomas (Lo et al., 2015).

Lo anterior va de la mano con otro de los mecanismos extrínsecos de CTLA-4, el cual es la transendocitosis de CD80 y CD86 de APCs. El reciclaje endosomal de CTLA-4 beneficia este mecanismo, ya que influye directamente en la eficiencia de eliminación de ligandos de la SI entre la célula T y las APCs (Qureshi et al., 2012).

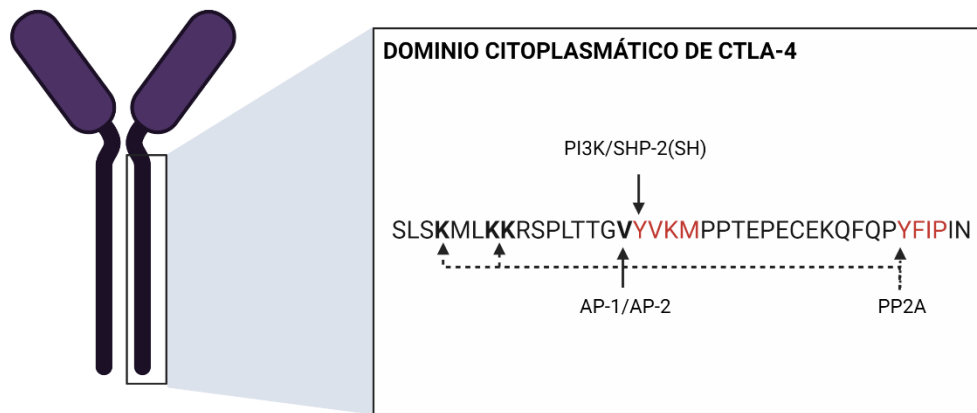


Figura 2. Motivos citoplasmáticos involucrados en la localización y el transporte celular de CTLA-4. El motivo YxxM se une al dominio SH2 de la tirosina fosfatasa SHP-2. En su forma no fosforilada, CTLA-4 se asocia con los adaptadores de clatrina AP-1 y AP-2. La serina/treonina proteína fosfatasa PP2A se una con la tirosina 218 (Y₂₁₈FIP) y el motivo rico en lisina (Schneider y Rudd, 2014). Imagen creada en BioRender.com

ESTRUCTURA DE CTLA-4

La expresión de CTLA-4 en células T está dada por el factor de transcripción NFAT1, el cual se une a la región promotora del gen y presenta una asociación con la acetilación de la histona H3. Por el contrario, al bloquear la interacción de NFAT1 y el promotor con ciclosporina A o 11R-VIVIT, se suprime su expresión (Gibson et al. 2007).

En relación con la estructura del gen de *CTLA4*, este se encuentra conformado por cuatro exones, de los cuales el exón 1 contiene la secuencia líder, el exón 2 codifica para el sitio de unión al ligando, el exón 3 para la región transmembranal y el exón 4 para la cola citoplasmática (Schneider y Rudd, 2014) (Figura 2A). Son cinco las isoformas de mRNA de CTLA-4 que se han identificado en PMBCs de humanos, todas derivadas de *splicing* alternativo (Gu, et al., 2008) (Figura 2B).

El producto amplificado de la isoforma membranal (mCTLA-4) tiene una longitud de 672 pares de bases (pb) y es la única isoforma que se transcribe desde el exón 1 al exón 4 (NM_005214.5, NCBI Annotation Project) (Gu, et al., 2008). Se ha reportado que la isoforma mCTLA-4 se puede expresar como homodímero, con un peso molecular de 48-50 kD, donde cada monómero que la conforma pesa 28-30 kD . La homodimerización de mCTLA-4 ocurre a través de los residuos de cisteína, ubicados en la región transmembranal (Esposito et al., 2014). No obstante, también se ha reportado que el monómero de CTLA-4 puede tener un peso molecular de 33-37 kD (Walunas et al., 1994).

En lo que se refiere a la isoforma soluble (sCTLA-4), el producto amplificado tiene una longitud de 562 pb (NM_001037631.3, NCBI Annotation Project) y se ha reportado que en células HeLa transfectadas, la masa molecular está

entre 24 y 26 kD. Sin embargo, tanto el peso molecular de mCTLA-4 y sCTLA-4 reportados difieren del peso molecular teórico, los cuales corresponden a 20.6 y 15.4 kD, respectivamente. Esto se debe a que, en ambas isoformas, se encuentran sitios de modificación postraduccional, específicamente en Asn¹¹³ y Asn¹⁴⁵ para *N*-glicosilación, que promueven la homodimerización de CTLA-4 (Esposito et al., 2014).

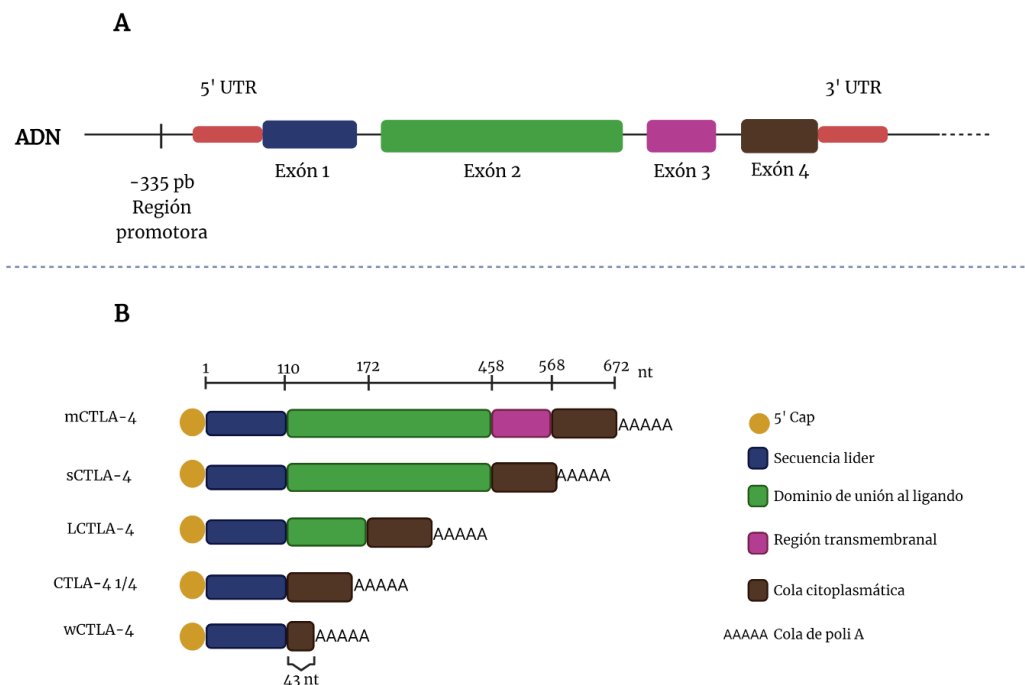


Figura 3. Representación esquemática de la estructura del gen de CTLA-4 (A) y de las isoformas del mRNA derivadas de *splicing* alternativo (B). En azul se observa el exón 1 que corresponde a la secuencia líder, en verde el exón 2 correspondiente al dominio de unión al ligando, en rosa el exón 3 que pertenece a la región transmembranal y en café el exón 4 que indica la cola citoplasmática. Imagen creada en BioRender.com

Con relación a las otras isoformas reportadas, la longitud del producto amplificado de LCTLA-4 es de 277 pb, transcribiéndose desde el exón 1, parte del exón 2 y todo el exón 4 (fragmento escindido por *splicing* desde 173 a 567 pb) (Gu, et al., 2008). Por otro lado, CTLA-4 1/4, también conocida como

ssCTLA-4, tiene una longitud de 214 pb, y está conformada por el exón 1 y el 4 (Ueda et al., 2003; Gu, et al., 2008). Asimismo, la isoforma más pequeña detectada se denomina wCTLA-4 y su longitud es de 171 pb (Gu, et al., 2008).

De igual forma, se descubrió que la isoforma mCTLA-4 se puede asociar a exosomas, denominándose como mvCTLA-4. Estas vesículas fueron caracterizadas en células T CD4⁺ activadas, poseen un diámetro entre 20 y 100 nm y expresan los marcadores de exosomales CD63 y LAMP2, ambos relacionados con exosomas de origen endocítico, lo cual sugiere que podrían estar jugando un papel en la comunicación intracelular y en la homeostasis inmunológica (Esposito et al., 2014).

CTLA-4 EN OTROS LINAJES CELULARES, ENFERMEDADES AUTOINMUNES Y EN NEOPLASIAS

Aunque mucha de la investigación sobre CTLA-4 se ha centrado alrededor de células T, diversos estudios han reportado su expresión en otros linajes celulares como las células B (Quandt et al., 2007), células NK (Davis-Marcisak et al., 2021), células dendríticas (DCs) (Han et al., 2014), queratinocitos (Zhou et al., 2019) y melanocitos (Mo et al., 2018), así como en diversas neoplasias que incluyen células B de leucemia linfocítica aguda (Pistillo et al., 2003) y crónica (Mittal et al., 2013), cáncer de mama (Contardi et al., 2005; Yu et al., 2015; Chen et al., 2017; Navarrete-Bernal et al., 2020) y melanoma (Laurent et al., 2013; Chakravarti et al., 2017; Mo et al., 2018).

Además, se ha visto que los polimorfismos presentes en *CTLA-4* dentro de regiones no codificantes influyen en la disminución de su expresión y esto se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades autoinmunes, como enfermedad de Graves, hipotiroidismo autoinmune, entre otras (Gibson et al. 2007).

Cabe destacar que son pocas las investigaciones que se centran en averiguar si las isoformas descritas, además de la isoforma mCTLA-4, desempeñan algún papel adicional que influya en la función celular o en el desarrollo de estas enfermedades. Por ejemplo, sCTLA-4 ha sido reportada como una molécula que se encuentra presente en el suero de los pacientes con melanoma tratados con Ipilimumab y es asociada al aumento de la supervivencia global (Leung et al., 2014). Esto va de la mano con los reportes que indican que sCTLA-4 es secretado por células T activadas y puede modular la vía CD28/CD80-CD86 (Esposito et al., 2014). No obstante, se desconoce el papel que estaría llevando a cabo.

Por otro lado, la detección de LCTLA-4 y wCTLA-4 se ha limitado a mRNA en pacientes con miastenia grave (Gu, et al., 2008), mientras que CTLA-4 1/4 ha sido reportada como una isoforma que, al contrario de su papel canónico, en modelos murinos puede llegar a aumentar la reactividad de las células T y, por consecuencia, promover la autoinmunidad (Liu et al., 2012).

Por lo que se refiere a la expresión de CTLA-4 en células tumorales, hasta el momento existen dos tendencias contrastantes en donde se sugiere que, por un lado, CTLA-4 está jugando un papel a favor de la evasión inmunitaria, y por el otro, induce la apoptosis de las células neoplásicas.

Un ejemplo de ello es la identificación de la expresión de CTLA-4 en células de tumores sólidos y hematológicos, incluyendo melanoma, donde se observó que CTLA-4 es capaz de unirse a la forma recombinante de CD80/CD86 e inducir apoptosis en conjunto con la activación secuencial de caspasa-8 y caspasa-3 (Contardi et al., 2005).

Dándole continuidad a la investigación anterior, Laurent y colaboradores (2013) reportaron que al interactuar células de melanoma CTLA-4⁺ con células NK en presencia de Ipilimumab, se desencadena la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) vía FcγRIIIA, promoviendo la secreción de TNF- α . Cabe resaltar que Ipilimumab no ejerce ningún efecto sobre la proliferación y viabilidad de las células de melanoma CTLA-4⁺.

Recientemente, a partir de un algoritmo de aprendizaje automático, se logró identificar una firma conservada en la activación de células NK en respuesta a terapia con anti-CTLA-4 en pacientes con melanoma, la cual se ha asociado con una mayor supervivencia global y es predictiva para la respuesta al tratamiento. Además, identificaron que las células NK expresan CTLA-4 en forma de homodímero en la membrana celular, con un peso molecular de ~95 kD, y como monómero intracelular con un peso de ~30 kD. Por otro lado, determinaron que Ipilimumab es capaz de interactuar con las células NK CTLA-4⁺ y su expresión está modulada por citocinas (IL-12 e IL-18), sugiriendo que CTLA-4 podría tener el mismo papel de *checkpoint* inmunológico en las células NK como lo es para células T (Davis-Marcisak et al., 2021).

Con relación a CTLA-4 y la evasión inmune, en un estudio donde utilizaron células tumorales de pacientes con melanoma tratados con Ipilimumab, se mostró que CTLA-4 es capaz de activar la vía de señalización PI3K-Akt, resultando en la inhibición de Bcl-2 e incrementando así la supervivencia celular (Chakravarti et al., 2017).

De la misma forma, se conoce que las células de cáncer de mama CTLA-4⁺ suprimen la maduración de DCs y la secreción de citocinas pro-inflamatorias,

como IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , entre otras. Al agregar un bloqueador, se promovió la apoptosis en las células neoplásicas y se restauró la maduración y función de las DCs (Chen et al., 2017).

En otro estudio se reportó que CTLA-4 aumenta su expresión en linfomas de células B y células B asociadas a melanoma, donde la interacción CTLA-4/sCD86 reclutó y activó a Tyk2-STAT3, resultando en la expresión de genes inmunosupresores, de supervivencia y proliferación. Por el contrario, al inhibir o silenciar CTLA-4 en dichas células, disminuyó el crecimiento tumoral y la proliferación y se indujo apoptosis (Herrmann et al., 2018).

De acuerdo con los antecedentes planteados, existe una necesidad de reevaluar el papel de CTLA-4 en la regulación inmunológica, tanto en individuos sanos como en enfermedad, ya que esta molécula parece estar llevando a cabo funciones críticas adicionales a su papel canónico que van de la mano con el microambiente y el tipo celular.

ANTECEDENTES DEL TRABAJO

Recientemente, a través de una colaboración entre el Laboratorio de Biología Celular de la UAM-Cuajimalpa y el INMEGEN, se realizó un meta-análisis de perfiles de expresión génica con el propósito de identificar potenciales biomarcadores tumorales de estadificación (Ortega-Bernal et al., 2018).

Algunos genes desregulados de manera significativa incluyen a *ADAMDEC1*, *MMP19*, *CXCL8* y *CXCL16*, los cuales codifican para proteínas secretadas y podrían ser potenciales biomarcadores sanguíneos para la detección temprana del melanoma.

De particular interés para este proyecto es la sobreexpresión de CTLA-4: en dicho proyecto se observó un aumento de 2.17 veces desde la transformación de melanocito a melanoma y en etapas metastásicas, con respecto a etapas tempranas y localizadas de la enfermedad. De la mano con el estado del arte mencionado anteriormente, la expresión de CTLA-4 en melanoma podría representar una ventaja en mecanismos de tolerancia inmunitaria, es decir con mecanismos relacionados con evasión, supervivencia y proliferación celular del melanoma.

JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con los antecedentes planteados, CTLA-4 ha sido postulada como una molécula con un papel dual, es decir, por una parte, podría inducir apoptosis en células tumorales y por otra, podría representar una ventaja del cáncer frente al sistema inmune para evadirlo. Conocer el papel que CTLA-4 está desempeñando en melanoma podría aportar nuevas perspectivas sobre la adquisición de mecanismos de evasión inmunitaria y de resistencia adquiridos a la inmunoterapia. Así nos planteamos contribuir a la caracterización y función de CTLA-4 en melanoma y melanocitos, evaluando su expresión y el efecto ante su bloqueo.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe una expresión elevada de CTLA-4 en líneas celulares de melanoma en comparación con los melanocitos, y su bloqueo modifica características distintivas de células neoplásicas?

HIPÓTESIS

CTLA-4 se expresará en mayor cantidad en células de melanoma en comparación con melanocitos y su bloqueo promoverá la apoptosis.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de CTLA-4 en células melanocíticas y de melanoma y determinar la actividad apoptótica ante su bloqueo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comprobar la expresión de CTLA-4 en la línea celular de melanocitos (HEMa) y en las líneas celulares de melanoma (A-375 y SK-MEL-31) mediante RT-PCR.
2. Validar la expresión de CTLA-4 en células de melanoma por medio de *Western blot*.
3. Determinar la localización de CTLA-4 en las líneas celulares mencionadas mediante citometría de flujo.
4. Evaluar el efecto apoptótico en una línea celular de melanoma ante el bloqueo de CTLA-4.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Se utilizó una línea celular de melanocitos no tumorigénica (HEMA) y dos líneas celulares de melanoma, A-375 y SK-MEL-31. La línea celular A-375 se cultivó con medio *Dulbecco's Modified Eagle* (DMEM, *UltraCruz*) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB); la línea celular SK-MEL-31 se cultivó con medio *Minimum essential Medium Eagle* (MEM, *Corning*) suplementado con 15% de SFB y, finalmente, la línea HEMA se cultivó con medio *Dermal Cell Basal* (ATCC, PCS-200-010) suplementado con el kit *Adult Melanocyte Growth* (ATCC, PCS200042).

Todas las células se cultivaron a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Se les dio mantenimiento a los cultivos mediante pases al alcanzar una confluencia del 70% o mayor.

Extracción de RNA total por el método de Trizol

La extracción de RNA se realizó una vez que los cultivos alcanzaron el 100% de confluencia. Las células se lavaron dos veces con PBS 1X, se les adicionó 1 mL de Trizol (*Gibco*) y se homogenizó la suspensión durante 2 min hasta que las células se lisaron. La suspensión celular obtenida se colocó en microtubos de 1.5 mL y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Después, se agregaron 200 µL de cloroformo, se mezcló con vórtex por 30 segundos, se incubó durante 2 min y se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C por 17 min.

Con precaución, la fase acuosa se transfirió a un nuevo microtubo de 1.5 mL. Para precipitar el RNA, se agregaron 500 µL de isopropanol y se incubó durante 15 min. Una vez pasado el tiempo, se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm por 15 min a 4°C y se eliminó el isopropanol.

El botón formado se lavó con 1 mL de etanol al 75%, se mezcló con vórtex y se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm por 10 min a 4°C. Se retiró el etanol y se dejó secar la pastilla de RNA a temperatura ambiente por 30 min. Finalmente, el botón se resuspendió en agua libre de RNasas. La concentración de RNA se determinó por espectrofotometría (A260nm/A280nm) (NanoDrop 2000 UV-Vis *Spectrophotometer Thermo Scientific*[®]) y se verificó su integridad por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%.

Detección del ARNm de CTLA-4 mediante RT-PCR

Se utilizaron 1.2383 µg de RNA total de las células A-375, 1.0257 µg de SK-MEL31 y 0.7458 µg de HEMa para las reacciones de transcripción reversa, donde, de acuerdo con las especificaciones del fabricante del kit *GeneAmp*[™] *RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems)*, primeramente se realizó una incubación a temperatura ambiente por 10 min, luego a 42°C por 15 min, después a 99°C por 5 min y finalmente a 5°C por 5 min en un termociclador *2720 Thermal Cycler*[®] (*Applied Biosystems*).

Una vez obtenido el DNA complementario (cDNA), se amplificó por PCR el exón 2 de CTLA-4 (los cebadores utilizados fueron F: 5'-TGGGGAATGAGTTGACCTTC-3', R: 5'-ATGAGCTCCACCTTGCAGAT-3'), a una temperatura de alineamiento de 55°C y de acuerdo con las especificaciones del fabricante del kit *GeneAmp*[™] *RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems)*. Como control positivo, se amplificó actina con los siguientes cebadores F: 5'-GGCTCAGAGCAAGAGAGGTATCC-3', R: 5'-GTAGAAGGTGTGGTGCCAGATCT-3', a una temperatura de alineamiento de 65°C en un termociclador *2720 Thermal Cycler*[®] de *Applied Biosystems*.

Una vez terminada la reacción, se continuó con la electroforesis en agarosa para observar el amplicón en un gel al 1.5% a 80 V teñido durante 15 min con bromuro de etidio (0.5 µg/mL).

Análisis de expresión de CTLA-4 mediante Western blot

Las líneas celulares A-375, SK-MEL-31 y HEMa, con una confluencia del 70%, fueron despegadas mediante raspado con la punta de una pipeta de 1 mL y se lisaron con amortiguador de lisis frío (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA pH 8.0 5 mM, NaCl 50 mM, Tritón x-100 1%) con inhibidor de proteasas (Roche). La suspensión se colocó en microtubos, se centrifugó a 2000 rpm durante 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Utilizando el kit *Pierce BCA protein assay #23227* de *Thermo Scientific*, se cuantificaron las proteínas totales, obteniendo una concentración de 3.51 µg/µL de células A-375, 0.92 µg/µL de SK-MEL-31 y 0.95 µg/µL de HEMa. Las proteínas totales (30 µg) de cada línea celular se separaron mediante electroforesis en un gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% (p/v) a 95 V durante 2 horas. Cabe mencionar que también se utilizaron 30 µg del control positivo *All Sill Whole Cell Lysate sc-364356* (*Santa Cruz Biotechnology*).

Una vez transcurrido el tiempo, se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa de 0.1 µm (*Amersham Protran, GE Healthcare Life science*) durante toda la noche a 50 V a 4 °C.

Una vez terminada la transferencia y para comenzar la inmunodetección de CTLA-4, se sumergió la membrana en solución bloqueadora al 6% (TBS-T (Tris 20 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween-20 0.05%) y leche sin grasa) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

Una vez bloqueada la membrana, el anticuerpo primario específico de CTLA-4 (F-8) sc-376016 (1:1000, *Santa Cruz Biotechnology*) fue diluido en solución bloqueadora al 6% e incubado durante toda la noche a 4° C en agitación constante. Después, se lavó la membrana con TBS-T, tres veces con una duración de diez minutos cada lavado a temperatura ambiente, y seguido de ello se incubó el anticuerpo secundario *Goat anti-mouse* HRP (1:5000, *Life Technologies*), diluido en solución bloqueadora al 6% durante 1 hora a temperatura ambiente.

Finalmente, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con TBS-T y se realizó el revelado con sustrato quimioluminiscente con el kit *Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate #34095 (Thermofisher)*. La detección se realizó mediante placa radiográfica y se usó un tiempo de revelado de 2 a 15 min de acuerdo con los resultados mostrados en la placa.

Una vez realizada la inmunodetección de CTLA-4, se procedió a realizar la inmunodetección del control de carga con el anticuerpo monoclonal β -actina (C4) sc-47778 (1:1000, *Santa Cruz Biotechnology*). Previamente a la inmunodetección, se lavó la membrana de nitrocelosa 3 veces cada 10 minutos con TBS-T y se procedió a bloquearla con solución bloqueadora al 6% durante 1 hora. Una vez bloqueada la membrana, se incubó del anticuerpo primario diluido en solución bloqueadora durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno y se incubó del anticuerpo secundario *Goat anti-mouse* HRP (1:5000, *Life Technologies*), diluido en solución bloqueadora al 6% durante 1 hora a temperatura ambiente.

Transcurrido ese tiempo, se procedió a realizar los tres lavados de 10 minutos cada uno con TBS-T y se realizó el revelado como previamente se describió.

De este análisis de expresión se realizaron tres experimentos independientes, como se mencionará más adelante en el apartado correspondiente al análisis estadístico.

Análisis de la expresión de CTLA-4 mediante citometría de flujo

Para evaluar la expresión intracelular de CTLA-4, a partir de una caja P100 se cosecharon las células con 80% de confluencia. Primeramente, se retiró el medio de cultivo y se lavaron con 1 mL de PBS. Después, se añadieron 300 μ L de *TrypLE™ Express Enzyme* (1X) (Gibco, #12604013) a temperatura ambiente y, mediante pipeteo, se desprendieron las células en su totalidad. Se transfirió la suspensión celular a tubos cónicos de 15 mL y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min a 4° C. El sobrenadante se descartó y después se lavaron dos veces con 500 μ L de PBS, centrifugando las células a 2000 rpm durante 5 min a 4° C. Una vez descartado el sobrenadante del segundo lavado, para el control de autofluorescencia, las células se resuspendieron en 200 μ L de PBS frío, se añadieron 200 μ L de FACS Flow y se dejaron reposar hasta su lectura.

Para la tinción intracelular de CTLA-4, las células se resuspendieron en 1 mL de *buffer* de permeabilización FCM (*Santa Cruz Biotechnology*, #sc-45063) y se incubaron en hielo durante 15 min. Para retirar el *buffer* de permeabilización, las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min a 4° C y el sobrenadante se descartó. Después, se lavaron las células dos veces con 1 mL de *buffer* de lavado FCM (*Santa Cruz Biotechnology*, #sc-45063) centrifugando a 2000 rpm durante 5 min a 4° C y descartando el sobrenadante.

Antes de realizar la inmunotinción, se cubrieron los tubos con papel aluminio. Luego, las células se resuspendieron e incubaron con el anticuerpo

monoclonal CTLA-4 (F-8) acoplado a Alexa Fluor[®] 488 (sc-376016 AF488, *Santa Cruz Biotechnology*) o con el control de isotipo normal mouse IgG1 acoplado a Alexa Fluor[®] 488 (sc-3890, *Santa Cruz Biotechnology*) a una dilución de 1:200 en *FACs Flow*. La incubación duró 1 hora a temperatura ambiente.

Una vez terminado el tiempo de incubación, las células se lavaron dos veces con 1 mL de *buffer* de lavado FCM (*Santa Cruz Biotechnology*, #sc-45063) y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min a 4° C.

Una vez descartado el sobrenadante del último lavado, las células se resuspendieron en 300 μ L de *buffer* de lavado y 200 μ L de *FACs Flow* y finalmente se leyeron en el citómetro de flujo BD *Biosciences FACS Calibur* y posteriormente se analizaron con ayuda del *software FCS express V3*.

Evaluación de CTLA-4 sobre la viabilidad celular de las células A-375

En una caja de 96 pozos, se sembraron 8×10^3 células de la línea A-375 con medio no suplementado, es decir, sin suero fetal bovino (SFB). Las condiciones experimentales fueron las siguientes: células sin tratamiento (NT), células que recibieron el bloqueador (α -CTLA-4), células que recibieron solamente el IFN- γ las células tratadas primeramente con IFN- γ y después con α -CTLA-4. Las células tratadas con IFN- γ recibieron una concentración de este de 20 ng/mL de (*Tombo Bioscience*, 21-8319-U250), exceptuando para los pozos correspondientes al *background* (DMEM+BSA 0.1%). Para el bloqueo de CTLA-4, se utilizó el anticuerpo anti-CTLA-4 (α -CTLA-4) (*Tombo Bioscience*, #40-1529-U500) a una concentración final de 20 ng/mL. Cada tratamiento tuvo una duración de 24 horas a 37°C y con 5% de CO₂.

Transcurrido el tiempo de tratamiento, se añadieron 10 μ l de la solución de CCK8 (Enzo, #ALX-850-039) a cada pozo y se volvieron a incubar durante 2 horas. Una vez pasado el tiempo, se leyó en el lector de placas a 450 nm. Los resultados obtenidos se filtraron y después se analizaron estadísticamente, como se menciona más adelante.

Evaluación de CTLA-4 sobre la apoptosis de las células A-375

En una caja de 6 pozos, se cultivaron 1.65×10^5 células de la línea A-375 en ausencia de SFB. Previo al bloqueo de CTLA-4, se estimuló la sobreexpresión de CTLA-4 con IFN- γ (Tombo Bioscience, 21-8319-U250) a una concentración de 20 ng/mL durante 24 horas. Después, se agregó α -CTLA-4 (Tombo Bioscience, #40-1529-U500) a una concentración de 20 ng/mL durante 6 horas.

Una vez transcurrido el tiempo, a las células se les retiró el medio, se despegaron con 200 μ L de *TrypLE™ Express Enzyme* (1X) (Gibco™, #12604013), y se resuspendieron en 300 μ L de PBS a temperatura ambiente. La suspensión celular se transfirió a un tubo de citometría de flujo, se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se lavaron las células con 1 mL de PBS y después se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante.

Seguido de lo anterior, se le añadió a cada muestra 5 μ L de *FITC Annexin V conjugate* (Tombo Biosciences, CAT# TNB-5000-L050) y 5 μ L de *7-AAD solution* (Tombo Biosciences, CAT# 13-6993-T200). Con gentileza, se distribuyó cada reactivo en el tubo y se incubaron en la oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, a cada tubo se le añadieron 400 μ L de *Annexin V Binding Buffer* (1X), se resuspendieron en 200

μL de buffer de fijación FCM 1X (900 μL de FACs + 100 μL de buffer de fijación 10X) (*Santa Cruz Biotechnology*, #sc-45063) y se leyeron en el citómetro de flujo *LSRFortessa* (BD *Biosciences*).

Análisis estadístico

Los resultados se derivan de tres experimentos independientes para *Western blot* y los ensayos de viabilidad celular, representados como media ± error estándar (SE). La comparación entre las medias se realizó con la prueba *ANOVA* y prueba de *Tukey*. Para determinar la significancia estadística se tomaron los valores de $*p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Expresión de CTLA-4 en las líneas celulares de melanoma y melanocitos

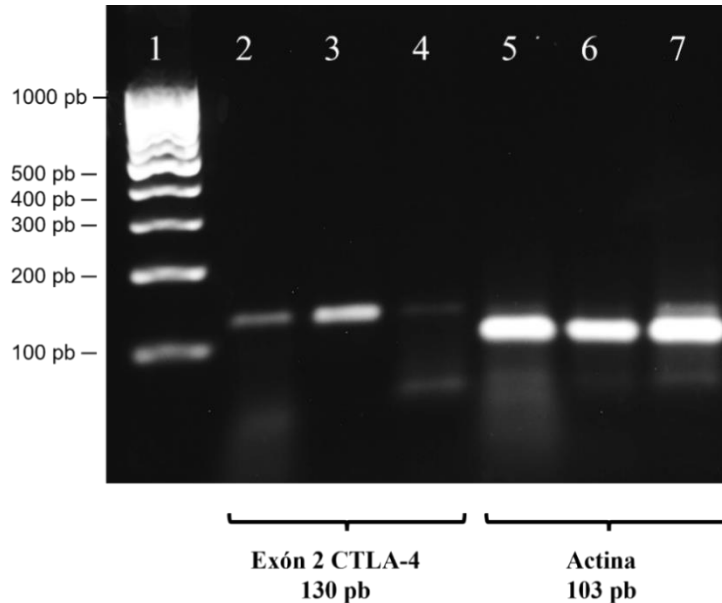


Figura 4. Análisis de RT-PCR de los transcritos de CTLA-4 en líneas celulares de melanoma y melanocitos. Tanto A-375 (carril 2), SK-MEL-31 (carril 3) y melanocitos (carril 4) expresan mCTLA-4. La región amplificada corresponde al exón 2, perteneciente al dominio de unión a ligando, con un tamaño de 130 pb. Como control interno se amplificó actina (103pb) (carriles 5, 6 y 7). El carril 1 corresponde al marcador de pares de bases.

Para validar los datos obtenidos en el meta-análisis mencionado en los antecedentes, relacionados al aumento de la expresión de CTLA-4 en melanoma con respecto a melanocitos, se analizó la expresión de CTLA-4 por RT-PCR (Figura 4), *Western blot* (Figura 5) y citometría de flujo (Figura 6). Los resultados confirman la expresión de mRNA de CTLA-4 en ambas líneas celulares de melanoma (A-375 y SK-MEL-31) y melanocitos (HEMa), y sugieren una sobreexpresión en células SK-MEL-31 (Figura 4). Es importante mencionar que, debido a que los cebadores están dirigidos hacia el exón 2, no

se puede discernir sobre cual isoforma está presente, ya que tanto mCTLA-4 como de sCTLA-4 poseen este exón (Figura 3).

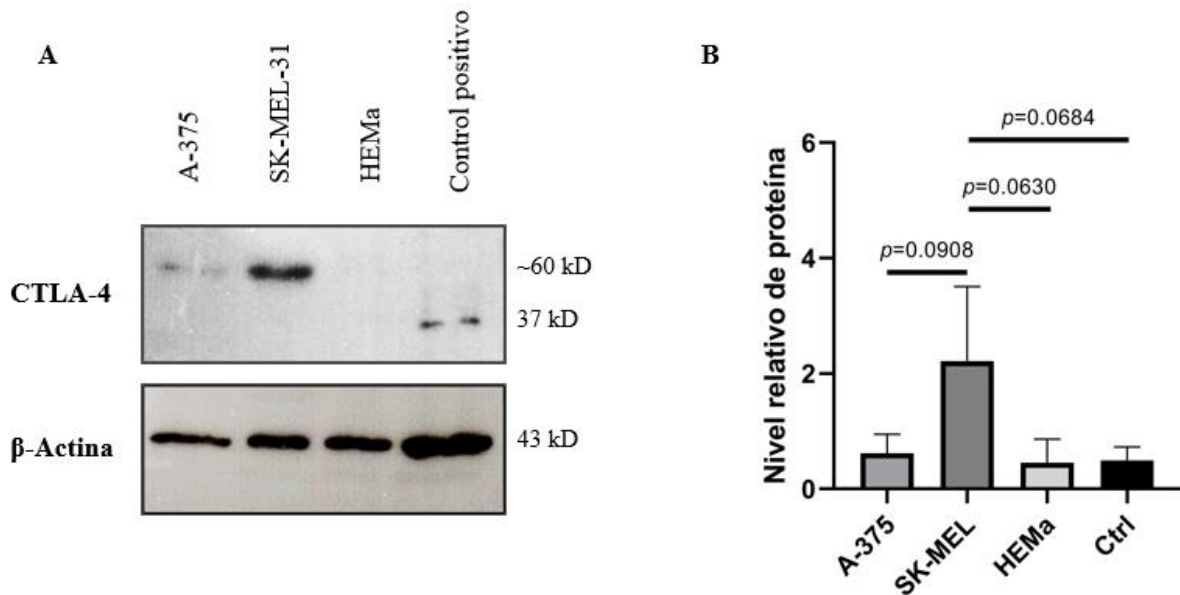


Figura 5. Detección de CTLA-4 mediante *Western blot* en las líneas celulares de melanoma y melanocitos. (A) En ambas líneas celulares de melanoma el monómero de CTLA-4 pesa ~60 kD (A-375 y SK-MEL-31). Las proteínas totales provenientes de células T con leucemia utilizadas como control positivo, contienen CTLA-4 en forma de monómero (37 kD). Se utilizó β-actina como control de carga. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. (B) Análisis desitométrico de las bandas obtenidas. Los datos se normalizaron utilizando la expresión de β-actina. Los datos graficados están presentados como media ± SE.

Al evaluar la expresión proteínica de CTLA-4 por *Western blot* en las tres líneas celulares, los resultados sugieren que SK-MEL-31 sobreexpresa CTLA-4 al doble respecto a A-375, mientras que en HEMa se observa una nula detección, probablemente debido a que la cantidad de proteína no fue suficiente para su detección (Figura 5A y 5B). La isoforma de CTLA-4 detectada por peso molecular podría corresponder a la membranal o soluble; sin embargo, no se observan otras bandas que se relacionen con otras isoformas de CTLA-4. Las gráficas representativas de los análisis

densitométricos mostraron que no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$).

Adicionalmente, mediante citometría de flujo se mostró que CTLA-4 está presente en las tres líneas celulares (Figura 6). Debido a que el epítipo que reconoce el anticuerpo se encuentra ubicado entre los residuos 195-223, localizados en la cola citoplasmática, se sugiere que la señal corresponde a la suma de CTLA-4 intracelular y de membrana plasmática. Sin embargo, mediante esta técnica no se pudo discernir qué tipo de isoforma fue la detectada.

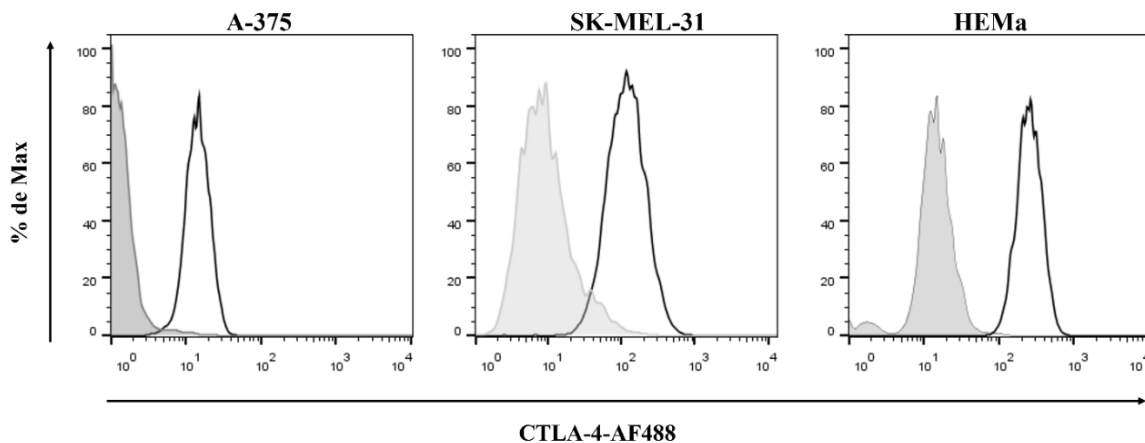


Figura 6. Perfiles de expresión de CTLA-4 en líneas celulares de melanoma y melanocitos. Las células fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas con el anticuerpo monoclonal CTLA-4-AF488 o el anticuerpo para el control de isotipo IgG1 AF488 y después fueron analizadas mediante citometría de flujo.

En conjunto, los resultados obtenidos confirman la presencia de CTLA-4 con distintos niveles de expresión en las líneas celulares SK-MEL-31, A-375 y HEMa. Para entender mejor su papel funcional en melanoma, se realizaron experimentos preliminares en la línea de melanoma A-375 y los resultados se explican a continuación. Se seleccionó esta línea celular por su facilidad de cultivo, tomando en cuenta las condiciones impuestas por la pandemia de

SARS-CoV-2, que limitaba el tiempo de trabajo presencial en el laboratorio experimental.

El bloqueo de CTLA-4 afecta la viabilidad de las células A-375

Para evaluar el efecto del bloqueo de CTLA-4 sobre la viabilidad celular de A-375, utilizamos un anticuerpo anti-CTLA-4 (α -CTLA-4). Debido a que se ha reportado que el IFN- γ puede estimular la sobreexpresión de CTLA-4 (ver apéndice), se evaluó a la par el efecto del IFN- γ sobre las células A-375 (Mo et al., 2018).

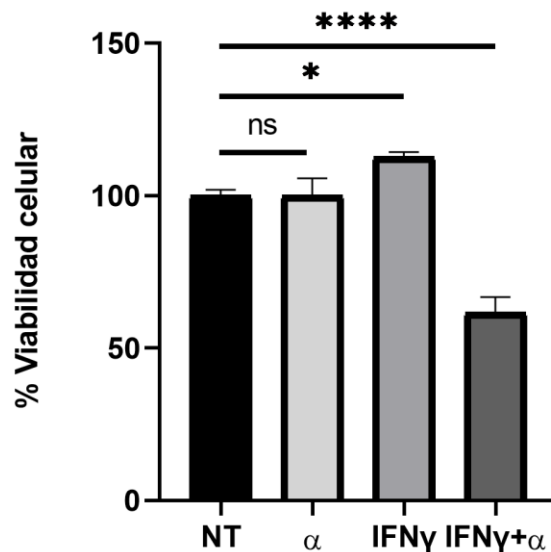


Figura 7. Cuantificación del porcentaje de viabilidad celular de A-375 frente al bloqueo de CTLA-4. Las células fueron cultivadas en presencia o ausencia de 20 ng/mL de IFN- γ o 20 ng/mL de α -CTLA-4, donde cada estímulo tenía una duración de 24 h. Los datos graficados están presentados como media \pm DE derivados de tres repeticiones biológicas. **** $p \leq 0.0001$ y * $p \leq 0.05$.

Al evaluar el efecto únicamente del α -CTLA-4 sobre las células A-375, no observamos diferencias significativas con respecto al control (Figura 7). Sin embargo, al evaluar el efecto del IFN- γ y de la combinación de IFN- γ / α -CTLA-4 en la viabilidad celular de A-375, los resultados mostraron

diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Se observó que el tratamiento con IFN- γ / α -CTLA-4 disminuyó la viabilidad celular en comparación con α -CTLA-4. Este resultado sugiere que IFN- γ puede estimular la sobreexpresión de CTLA-4 también en las células A-375. Además, los resultados indican que la sola presencia de IFN- γ aumenta la viabilidad celular.

De acuerdo con los resultados anteriores, se exploró si el bloqueo de CTLA-4 en células A-375 previamente estimuladas con IFN- γ activaba la muerte celular vía apoptosis. Los resultados preliminares del ensayo de apoptosis mostraron que, después de 24 horas de tratamiento con IFN- γ y 6 horas con α -CTLA-4, hay un aumento de señal en el cuadrante correspondiente a apoptosis temprana (3.18% vs 1.19%), lo que sugiere que después del bloqueo de CTLA-4 se comienza a observar muerte celular en las células A-375 (Figura 8). Se necesitan experimentos adicionales en donde solo se observe el efecto del bloqueo sobre la apoptosis sin el estímulo previo con IFN- γ .

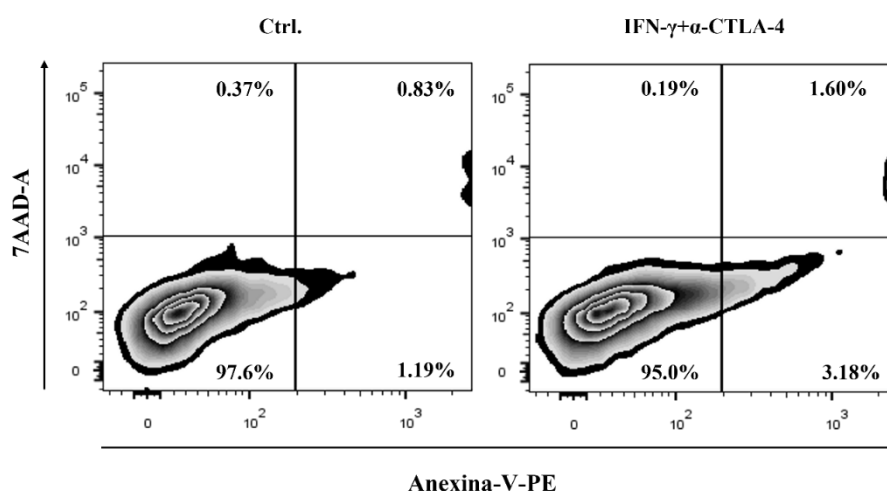


Figura 8. Estandarización del ensayo de apoptosis con Anexina V/7AAD en células A-375. Los resultados preliminares muestran el porcentaje de células vivas, en pre-apoptóticas y apoptóticas en células de melanoma que fueron tratadas con 20 ng/mL de IFN- γ durante 24 horas y después con 20 ng/mL de α -CTLA-4 durante otras 6 horas adicionales.

DISCUSIÓN

Los pacientes que presentan melanoma en etapa metastásica y que son tratados con quimioterapia, tienen una tasa de supervivencia por debajo del 16% a 5 años, mientras que los que no reciben tratamiento, tienen una esperanza de vida de 1 año. En los últimos años se han visto resultados favorecedores relacionados con la terapia dirigida y la inmunoterapia para el tratamiento de pacientes con esta neoplasia, logrando disminuir la progresión e incrementando la supervivencia global (Bomar, Senithilnathan y Ahn, 2019). No obstante, se ha observado que existen mecanismos de resistencia y evasión que involucran la expresión de *checkpoints* inmunitarios. Tal es el caso de LAG-3, el cual se expresa en células de melanoma y, ya sea la isoforma soluble o transmembranal, otorga protección frente a apoptosis al interactuar con MHC-II. En este mecanismo protector están involucradas las vías MAPK/Erk y PI3K/Akt (Hemon et al., 2011).

En un estudio adicional se observó que, en tejidos de cáncer de mama, a través de la desmetilación del ADN y la trimetilación de H3K27 y H3K9 ubicadas en las regiones promotoras, se sobre regula la transcripción de múltiples *checkpoints* inmunitarios, incluyendo a PD-1, CTLA-4, TIM-3 y LAG-3 (Sasidharan et al., 2018). Aunado a lo anterior, se resalta la importancia de dilucidar los mecanismos celulares subyacentes de CTLA-4 en un contexto diferente al de las células T.

En este estudio se identificó que CTLA-4 se encuentra sobreexpresado en las líneas celulares de melanoma frente a melanocitos, siendo SK-MEL-31 la línea con una mayor abundancia del ARNm y la proteína (Figuras 4 y 5). Es importante resaltar que A-375 ha sido reportada como una línea celular con baja capacidad metastásica (Kozlowski et al., 1984; Kim et al., 2017), por lo

que podría sugerirse que la expresión de CTLA-4 dependería del estadio del melanoma. Esta hipótesis concuerda con los resultados reportados por Mo y colaboradores (2018), donde al evaluar la expresión relativa de CTLA-4 en las líneas celulares de melanoma A-375 y A2058, esta última reportada como una línea celular con alta capacidad metastásica (Kim et al., 2017), se mostró que en A2058, CTLA-4 se expresa con una tasa de cambio 1000 veces mayor frente a la expresión de A-375.

Por otro lado, los resultados obtenidos mediante *Western blot* indican que CTLA-4 se sobreexpresa a nivel de proteína en ambas líneas celulares de melanoma (Figura 5). Cabe destacar que el peso molecular de CTLA-4 encontrado (~60 kD) es mayor al reportado (33-37 kD) (Walunas et al., 1994). Esta variación en los pesos moleculares se podría atribuir a modificaciones postraduccionales, ya que tanto mCTLA-4 como sCTLA-4 poseen sitios para *N*-glicosilación (Esposito et al., 2014).

En ese sentido, se ha reportado que la glicosilación de proteínas puede influir en la capacidad de evasión inmunitaria, potenciando la interacción de los *checkpoints* inmunitarios en la membrana celular. Eso sucede en el caso de PD-L1 en cáncer de mama triple negativo, en donde la glicosilación de N¹⁹², N²⁰⁰ y N²¹⁹ permite su estabilización, impidiendo su ubiquitinación y degradación por el proteosoma 26S (Li et al., 2016). Se tendría que evaluar si este fenómeno se relaciona con CTLA-4 presentes en células de melanoma y melanocitos.

También se logró localizar a CTLA-4 de forma intracelular (Figura 6), aunque no se descarta que además se esté visualizando a CTLA-4 expresado en la membrana celular. De manera general, cuando el linfocito T se encuentra activo, CTLA-4 suele estar en la red del trans-Golgi o en endosomas, de

donde puede ser reciclado (Schneider, H., & Rudd, C. E., 2014). En el contexto de células de melanoma y de melanocitos, se desconoce el significado biológico de su localización preferencial. Para discriminar entre la proteína localizada en membrana plasmática y la localizada en membranas intracelulares, se requieren de anticuerpos que se dirijan a un epítipo extracelular de CTLA-4.

Con relación a las isoformas de CTLA-4, nuestros resultados experimentales tienen limitaciones para establecer claramente su presencia en las células de melanoma y melanocitos. Como se describió anteriormente, aún no se conocen a profundidad los papeles que estarían presentado en el microambiente celular y tumoral. Se sabe que la expresión de la isoforma membranal asociada a microvesículas (mvCTLA-4) podría ser de especial interés debido a que diversos estudios han demostrado que las vesículas extracelulares (EVs) derivadas de melanoma influyen en la generación del fenotipo inmunosupresor mediante dos vías: la primera, polarizando la diferenciación de los monocitos a células mieloides supresoras a través de la transferencia de *sets* de miRNAs, y la segunda, mediante chaperonas HSP que activan diversos TLR, derivando en la inducción de PD-L1 (Huber et al., 2018; Fleming et al., 2019). Además, en un contexto inmunitario, se mostró que las células dendríticas derivadas de la médula ósea generan EVs que contienen a CTLA-4, el cual compite con los ligandos CD80/CD86 (Halpert et al., 2016). En todo caso, si CTLA-4 se libera a través de EVs en melanoma, podría desempeñar un papel inmunosupresor en un microambiente tumoral.

Por otra parte, en los ensayos de viabilidad celular (Figura 7) se observó que al recibir el tratamiento con IFN- γ / α -CTLA-4, se produce una disminución significativa en la viabilidad celular. Aunque se requieren más estudios para

esclarecer esta observación, una posibilidad es que el pre-tratamiento con IFN- γ podría estar provocando la translocación membranal de CTLA-4 desde su localización intracelular, dejándolo accesible a la unión con el anticuerpo anti-CTLA-4 y que, a su vez, esta unión desencadenará alguna señalización. Esta hipótesis se basa en el hecho de que las células sin pre-tratamiento con IFN- γ pero expuestas a anti-CTLA-4 tienen el mismo nivel de viabilidad que las células control. Por ese lado, diversos estudios han reportado que en respuesta al microambiente tumoral (TME), IFN- γ puede promover la síntesis de *checkpoints* inmunitarios o activar diversos mecanismos inmunosupresores (Jorgovanovic et al. 2020). Además, un estudio demostró que la exposición crónica a dosis bajas de IFN- γ en líneas celulares de hepatoma H22, adenocarcinoma mamario MA782/55 y melanoma B16, provoca el desarrollo tumoral y la expresión de PD-L1, PD-L2, CTLA-4 y FOXP3, moléculas que median parcialmente la evasión tumoral (He et al., 2005).

Cabe resaltar que Mo y colaboradores (2018) reportaron que, en células de melanoma y melanocitos, IFN- γ activó la expresión de CTLA-4 a través JAK1/2 dependiente de la fosforilación de STAT1, el cual recluta a CBP y a POLII en el promotor de CTLA-4 y modulan la acetilación de histonas.

Con relación a lo anterior, se observó que la eficiencia de la terapia anti-CTLA-4 podría ser dependiente de IFN- γ , pues con datos de secuenciación del exosoma completo se mostró que tumores de melanoma resistentes a la inmunoterapia tienen defectos en la señalización de IFN- γ , involucrando la pérdida de *IFNGR1*, *IRF-1*, *JAK2* e *IFNGR22*, genes propios de la vía canónica (Gao et al., 2016; Mo et al. 2018). Estas investigaciones indican que la señalización vía IFN- γ y su relación con la expresión de CTLA-4 es un

circuito que podría estar jugando un papel importante en el desarrollo y evolución del melanoma.

Finalmente, con base en los resultados preliminares obtenidos en el ensayo de apoptosis (Figura 8), se propone realizar experimentos que confirmen que el bloqueo de CTLA-4 en células de melanoma induce esta vía de muerte celular. En caso de que se compruebe esta hipótesis, se justifica su estudio para determinar a detalle este mecanismo y las moléculas involucradas.

CONCLUSIÓN

En este trabajo se demostró que CTLA-4 es sobreexpresado en líneas celulares de melanoma en comparación con melanocitos, tanto a nivel de transcrito como de proteína, confirmando su presencia a nivel intracelular. Por otra parte, se determinó que el estímulo de IFN- γ es necesario para observar un efecto funcional del bloqueo con anti-CTLA-4. Finalmente, los resultados mostraron que el bloqueo de CTLA-4 en células de melanoma podría estar activando mecanismos de muerte celular. Estudiar la función de CTLA-4 en melanoma resulta atractivo para entender los mecanismos de progresión y supervivencia en el desarrollo de la enfermedad, lo cual podría promover nuevas perspectivas en lo que se refiere al tratamiento con terapias anti-CTLA-4.

PERSPECTIVAS

- Cuantificar CTLA-4 en líneas celulares que representen diferentes estadios de melanoma.
- Evaluar el efecto de la *N*-glicosilación de CTLA-4 en melanoma.
- Identificar y caracterizar a CTLA-4 en vesículas extracelulares derivadas de células de melanoma.
- Evaluar la escisión del gen de *CTLA-4* con CRISPR/Cas.
- Evaluar el efecto en la metástasis de melanoma ante el bloqueo de CTLA-4 y la escisión de su gen en un modelo *in ovo*.

REFERENCIAS

- Bomar, L., Senithilnathan, A., & Ahn, C. (2019). Systemic therapies for advanced melanoma. *Dermatologic Clinics*, 37(4), 409-423.
- Chakravarti, N., Ivan, D., Trinh, V. A., Glitza, I. C., Curry, J. L., Torres-Cabala, C., ... Hwu, W. J. (2017). High cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 and phosphoAkt expression in tumor samples predicts poor clinical outcomes in ipilimumab treated melanoma patients. *Melanoma Research*, 27(1), 24–31. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000305>
- Chen, X., Shao, Q., Hao, S., Zhao, Z., Wang, Y., Guo, X., ... & Mao, H. (2017). CTLA-4 positive breast cancer cells suppress dendritic cells maturation and function. *Oncotarget*, 8(8), 13703.
- Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A., & Tymińska, A. (2013). Skin melanocytes: Biology and development. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, 30(1), 30–41. <https://doi.org/10.5114/pdia.2013.33376>
- Contardi, E., Palmisano, G. L., Tazzari, P. L., Martelli, A. M., Falà, F., Fabbi, M., ... Pistillo, M. P. (2005). CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction. *International Journal of Cancer*, 117(4), 538–550. <https://doi.org/10.1002/ijc.21155>
- Davis-Marcisak, E. F., Fitzgerald, A. A., Kessler, M. D., Danilova, L., Jaffee, E. M., Zaidi, N., Weiner, L. M., & Fertig, E. J. (2021). Transfer learning between preclinical models and human tumors identifies a conserved NK cell activation signature in anti-CTLA-4 responsive tumors. *Genome Medicine*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00944-5>

Domínguez-Pantoja, M., López-Herrera, G., Romero-Ramírez, H., Santos-Argumedo, L., Chávez-Rueda, A. K., Hernández-Cueto, Á., ... & Rodríguez-Alba, J. C. (2018). CD38 protein deficiency induces autoimmune characteristics and its activation enhances IL-10 production by regulatory B cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 87(6), e12664.

Egner, J. R. (2010). *AJCC Cancer Staging Manual*. JAMA. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1525>

Esposito, L., Hunter, K. M. D., Clark, J., Rainbow, D. B., Stevens, H., Denesha, J., ... Wicker, L. S. (2014). Investigation of Soluble and Transmembrane CTLA-4 Isoforms in Serum and Microvesicles. *The Journal of Immunology*, 193(2), 889–900. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303389>

Fleming, V., Hu, X., Weller, C., Weber, R., Groth, C., Riester, Z., Hüser, L., Sun, Q., Nagibin, V., Kirschning, C., Bronte, V., Utikal, J., Altevogt, P., & Umansky, V. (2019). Melanoma extracellular vesicles generate immunosuppressive myeloid cells by upregulating PD-L1 via TLR4 signaling. *Cancer Research*, 79(18). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0053>

Gallegos Hernández, J. F., Gallegos Hernández, J. F., & Nieweg, O. E. (2014). Melanoma cutáneo (Mc): Diagnóstico y tratamiento actuales. *Gaceta Medica de Mexico*, 150, 175–182.

Gao, J., Shi, L. Z., Zhao, H., Chen, J., Xiong, L., He, Q., Chen, T., Roszik, J., Bernatchez, C., Woodman, S. E., Chen, P. L., Hwu, P., Allison, J. P., Futreal, A., Wargo, J. A., & Sharma, P. (2016). Loss of IFN- γ Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy. *Cell*, 167(2). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.069>

Gibson, H. M., Hedgcock, C. J., Aufiero, B. M., Wilson, A. J., Hafner, M. S., Tsokos, G. C., & Wong, H. K. (2007). Induction of the CTLA-4 Gene in Human Lymphocytes Is Dependent on NFAT Binding the Proximal Promoter. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.3831>

Greenwald, R. J., Oosterwegel, M. A., van der Woude, D., Kubal, A., Mandelbrot, D. A., Boussiotis, V. A., & Sharpe, A. H. (2002). CTLA-4 regulates cell cycle progression during a primary immune response. *European journal of immunology*, 32(2), 366-373.

Gu, D., Ao, X., Yang, Y., Chen, Z., & Xu, X. (2018). Soluble immune checkpoints in cancer: Production, function, and biological significance. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0449-0>

Gu, M., Kakoulidou, M., Giscombe, R., Pirskanen, R., Lefvert, A. K., Klareskog, L., & Wang, X. B. (2008). Identification of CTLA-4 isoforms produced by alternative splicing and their association with myasthenia gravis. *Clinical Immunology*, 128(3), 374-381. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.05.006>

Halpert, M. M., Konduri, V., Liang, D., Chen, Y., Wing, J. B., Paust, S., Levitt, J. M., & Decker, W. K. (2016). Dendritic Cell-Secreted Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein-4 Regulates the T-cell Response by Downmodulating Bystander Surface B7. *Stem Cells and Development*, 25(10). <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0009>

Han, Y., Chen, Z., Yang, Y., Jiang, Z., Gu, Y., Liu, Y., ... & Cao, X. (2014). Human CD14 CTLA-4 regulatory dendritic cells suppress T cell response via

CTLA-4-dependent IL-10 and IDO production in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 59, 567-579.

He, Y. F., Wang, X. H., Zhang, G. M., Chen, H. T., Zhang, H., & Feng, Z. H. (2005). Sustained low-level expression of interferon- γ promotes tumor development: Potential insights in tumor prevention and tumor immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 54(9). <https://doi.org/10.1007/s00262-004-0654-1>

Hemon, P., Jean-Louis, F., Ramgolam, K., Brignone, C., Viguier, M., Bachelez, H., Triebel, F., Charron, D., Aoudjit, F., Al-Daccak, R., & Michel, L. (2011). MHC Class II Engagement by Its Ligand LAG-3 (CD223) Contributes to Melanoma Resistance to Apoptosis. *The Journal of Immunology*, 186(9). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002050>

Herrmann, A., Lahtz, C., Nagao, T., Song, J. Y., Wing, C., Lee, H., ... Kwak, L. (2018). CTLA4 promotes Tyk2-STAT3 dependent B cell oncogenicity. *Andreas*. 77(18), 5118–5128. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0342.CTLA4>

Huber, V., Vallacchi, V., Fleming, V., Hu, X., Cova, A., Dugo, M., Shahaj, E., Sulsenti, R., Vergani, E., Filipazzi, P., De Laurentiis, A., Lalli, L., Guardo, L. Di, Patuzzo, R., Vergani, B., Casiraghi, E., Cossa, M., Gualeni, A., Bollati, V., ... Rivoltini, L. (2018). Tumor-derived microRNAs induce myeloid suppressor cells and predict immunotherapy resistance in melanoma. *Journal of Clinical Investigation*, 128(12). <https://doi.org/10.1172/JCI98060>

Jorgovanovic, D., Song, M., Wang, L., & Zhang, Y. (2020). Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: A review. In *Biomarker Research* (Vol. 8, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00228-x>

Khaghanzadeh, N., Erfani, N., Ghayumi, M. A., & Ghaderi, A. (2010). CTLA4 gene variations and haplotypes in patients with lung cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2009.09.001>

Kim, H. Y., Lee, H., Kim, S. H., Jin, H., Bae, J., & Choi, H. K. (2017). Discovery of potential biomarkers in human melanoma cells with different metastatic potential by metabolic and lipidomic profiling. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08433-9>

Kozlowski, J. M., Hart, I. R., Fidler, I. J., & Hanna, N. (1984). A human melanoma line heterogeneous with respect to metastatic capacity in athymic nude mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 72(4). <https://doi.org/10.1093/jnci/72.4.913>

Laurent, S., Queirolo, P., Boero, S., Salvi, S., Piccioli, P., Boccardo, S., Minghelli, S., Morabito, A., Fontana, V., Pietra, G., Carrega, P., Ferrari, N., Tosetti, F., Chang, L. J., Mingari, M. C., Ferlazzo, G., Poggi, A., & Pistillo, M. P. (2013). The engagement of CTLA-4 on primary melanoma cell lines induces antibody-dependent cellular cytotoxicity and TNF- α production. *Journal of Translational Medicine*, 11(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-108>

Ledford, H. (2011). Melanoma drug wins US approval. In *Nature* (Vol. 471, Issue 7340). <https://doi.org/10.1038/471561a>

Leonardi, G. C., Falzone, L., Salemi, R., Zanghì, A., Spandidos, D. A., Mccubrey, J. A., ... Libra, M. (2018). Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *International Journal of Oncology*, 52(4), 1071–1080. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4287>

Leung M., A. M., Lee, A. F., Ozao-Choy, J., Ramos, R. I., Hamid, O., O'Day, S. J., Shin-Sim, M., Morton L., D. L., Faries B., M. B., Sieling A., P. A., & Lee, D. J. (2014). Clinical benefit from ipilimumab therapy in melanoma patients may be associated with serum CTLA4 levels. *Frontiers in Oncology*, 4 MAY. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00110>

Li, C. W., Lim, S. O., Xia, W., Lee, H. H., Chan, L. C., Kuo, C. W., Khoo, K. H., Chang, S. S., Cha, J. H., Kim, T., Hsu, J. L., Wu, Y., Hsu, J. M., Yamaguchi, H., Ding, Q., Wang, Y., Yao, J., Lee, C. C., Wu, H. J., ... Hung, M. C. (2016). Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12632>

Linsley, P. S., Wallace, P. M., Johnson, J., Gibson, M. G., Greene, J. A. L., Ledbetter, J. A., Singh, C., & Tepper, M. A. (1992). Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science*, 257(5071). <https://doi.org/10.1126/science.1496399>

Linsley, P. S., Bradshaw, J., Greene, J. A., Peach, R., Bennett, K. L., & Mittler, R. S. (1996). Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity*, 4(6). [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80480-X](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80480-X)

Liu, S. M., Sutherland, A. P. R., Zhang, Z., Rainbow, D. B., Quintana, F. J., Paterson, A. M., Sharpe, A. H., Oukka, M., Wicker, L. S., & Kuchroo, V. K. (2012). Overexpression of the CTLA-4 Isoform Lacking Exons 2 and 3 Causes Autoimmunity. *The Journal of Immunology*, 188(1). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102042>

Lo, B., Zhang, K., Lu, W., Zheng, L., Zhang, Q., Kanellopoulou, C., Zhang, Y., Liu, Z., Fritz, J. M., Marsh, R., Husami, A., Kissell, D., Nortman, S., Chaturvedi, V., Haines, H., Young, L. R., Mo, J., Filipovich, A. H., Bleesing, J. J., ... Jordan, M. B. (2015). Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science*, 349(6246). <https://doi.org/10.1126/science.aaa1663>

Mittal, A. K., Chaturvedi, N. K., Rohlfen, R. A., Gupta, P., Joshi, A. D., Hegde, G. V., Bociek, R. G., & Joshi, S. S. (2013). Role of CTLA4 in the Proliferation and Survival of Chronic Lymphocytic Leukemia. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070352>

Mo, X., Zhang, H., Preston, S., Martin, K., Zhou, B., Vadalia, N., ... Zaidi, M. R. (2018). Interferon- γ signaling in melanocytes and melanoma cells regulates expression of CTLA-4. *Cancer Research*, 78(2), 436–450. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1615>

Nagaraju, K., Raben, N., Villalba, M. L., Danning, C., Loeffler, L. A., Lee, E., Tresser, N., Abati, A., Fetsch, P., & Plotz, P. H. (1999). Costimulatory markers in muscle of patients with idiopathic inflammatory myopathies and in cultured muscle cells. *Clinical Immunology*, 92(2). <https://doi.org/10.1006/clim.1999.4743>

Navarrete-Bernal, M. G. C., Cervantes-Badillo, M. G., Martínez-Herrera, J. F., Lara-Torres, C. O., Gerson-Cwilich, R., Zentella-Dehesa, A., Ibarra-Sánchez, M. de J., Esparza-López, J., Montesinos, J. J., Cortés-Morales, V. A., Osorio-Pérez, D., Villegas-Osorno, D. A., Reyes-Sánchez, E., Salazar-Sojo, P., Tallabs-Utrilla, L. F., Romero-Córdoba, S., & Rocha-Zavaleta, L. (2020). Biological Landscape of Triple Negative Breast Cancers Expressing CTLA-4.

Frontiers in Oncology, 10(August), 1–20.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01206>

Ortega-Bernal, D., GONZÁLEZ-DE LA ROSA, C. H., Arechaga-Ocampo, E., Alva-rez-Avitia, M. A., Moreno, N. S., & Rangel-Escareño, C. (2018). A meta-analysis of transcriptome datasets characterizes malignant transformation from melanocytes and nevi to melanoma. *Oncology Letters*, 16(2), 1899–1911. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8861>

Oyewole-Said, D., Konduri, V., Vazquez-Perez, J., Weldon, S. A., Levitt, J. M., & Decker, W. K. (2020). Beyond T-Cells: Functional Characterization of CTLA-4 Expression in Immune and Non-Immune Cell Types. In *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.608024>

Pistillo, M. P., Tazzari, P. L., Palmisano, G. L., Pierri, I., Bolognesi, A., Ferlito, F., Capanni, P., Polito, L., Ratta, M., Pileri, S., Piccioli, M., Basso, G., Rissotto, L., Conte, R., Gobbi, M., Stirpe, F., & Ferrara, G. B. (2003). CTLA-4 is not restricted to the lymphoid cell lineage and can function as a target molecule for apoptosis induction of leukemic cells. *Blood*, 101(1), 202–209. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1668>

Quandt, D., Hoff, H., Rudolph, M., Fillatreau, S., & Brunner-Weinzierl, M. C. (2007). A New Role of CTLA-4 on B Cells in Thymus-Dependent Immune Responses In Vivo. *The Journal of Immunology*, 179(11). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7316>

Qureshi, O. S., Kaur, S., Hou, T. Z., Jeffery, L. E., Poulter, N. S., Briggs, Z., Kenefeck, R., Willox, A. K., Royle, S. J., Rappoport, J. Z., & Sansom, D. M. (2012). Constitutive clathrin-mediated endocytosis of CTLA-4 persists during

T cell activation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(12).
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.304329>

Robert, C., Karaszewska, B., Schachter, J., Rutkowski, P., Mackiewicz, A., Stroiakovski, D., ... Schadendorf, D. (2015). Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *New England Journal of Medicine*, 372(1), 30–39. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1412690>

Sasidharan Nair, V., El Salhat, H., Taha, R. Z., John, A., Ali, B. R., & Elkord, E. (2018). DNA methylation and repressive H3K9 and H3K27 trimethylation in the promoter regions of PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, TIGIT, and PD-L1 genes in human primary breast cancer. *Clinical Epigenetics*, 10(1).
<https://doi.org/10.1186/s13148-018-0512-1>

Schneider, H., & Rudd, C. E. (2014). Diverse mechanisms regulate the surface expression of immunotherapeutic target CTLA-4. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 5, Issue DEC). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00619>

Su, T. H., Chang, T. Y., Lee, Y. J., Chen, C. K., Liu, H. F., Chu, C. C., ... Yang, Y. C. (2007). CTLA-4 gene and susceptibility to human papillomavirus-16-associated cervical squamous cell carcinoma in Taiwanese women. *Carcinogenesis*. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm043>

Ueda, H., Howson, J. M. M., Esposito, L., Heward, J., Snook, H., Chamberlain, G., Rainbow, D. B., Hunter, K. M. D., Smith, A. N., Di Genova, G., Herr, M. H., Dahlman, I., Payne, F., Smyth, D., Lowe, C., Twells, R. C. J., Howlett, S., Healy, B., Nutland, S., ... Gough, S. C. L. (2003). Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*, 423(6939), 506–511. <https://doi.org/10.1038/nature01621>

Vaidya, B., & Pearce, S. (2004). The emerging role of the CTLA-4 gene in autoimmune endocrinopathies. In *European Journal of Endocrinology*. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1500619>

Walunas, T. L., Lenschow, D. J., Bakker, C. Y., Linsley, P. S., Freeman, G. J., Green, J. M., Thompson, C. B., & Bluestone, J. A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, 1(5). [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90071-X](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90071-X)

Wang, X. B., Zheng, C. Y., Giscombe, R., & Lefvert, A. K. (2001). Regulation of surface and intracellular expression of CTLA-4 on human peripheral T cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 54(5). <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2001.00985.x>

Wang, X. B., Giscombe, R., Yan, Z., Heiden, T., Xu, D., & Lefvert, A. K. (2002). Expression of CTLA-4 by human monocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 55(1). <https://doi.org/10.1046/j.0300-9475.2001.01019.x>

Wolchok, J. D., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Rutkowski, P., Grob, J. J., Cowey, C. L., ... Larkin, J. (2017). Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 377(14), 1345–1356. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709684>

Yu, H., Yang, J., Jiao, S., Li, Y., Zhang, W., & Wang, J. (2015). Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 expression in human breast cancer: implications for prognosis. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. <https://doi.org/10.1007/s00262-015-1696-2>

Zhang, C. Y., Zhang, J., Ma, Y. F., Zhe, H., Zhao, R., & Wang, Y. Y. (2019). Prognostic Value of Combined Analysis of CTLA-4 and PLR in Esophageal

Squamous Cell Carcinoma (ESCC) Patients. *Disease Markers*, 2019, 1601072.
<https://doi.org/10.1155/2019/1601072>

Zhou, Q., Chen, L., Song, Y., Ma, L., Xiao, P., Chen, L., Zhen, H., Han, R., Chen, X., Sun, S., Wang, T., Zhang, B., Wang, Q., & Cheng, H. (2019). Induction of co-inhibitory molecule CTLA-4 by human papillomavirus E7 protein through downregulation of histone methyltransferase JHDM1B expression. *Virology*, 538. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.10.001>

APÉNDICE

Se verificó si el tratamiento con IFN- γ aumentaba la expresión de CTLA-4 en la línea celular A-375, tal como lo había reportado Mo y colaboradores (2018).

Metodología

Se prepararon las diluciones correspondientes a 10 ng/mL, 20 ng/mL, 40 ng/mL y 100 ng/mL de IFN- γ o PMA/I [50 ng/mL/500 ng/mL] (Domínguez-Pantoja et al., 2018) en DMEM sin suplementar. En cada dilución se resuspendieron 1.65×10^5 células de A-375 previamente cosechadas, las cuales fueron cultivadas en ausencia de SFB. formando una suspensión celular con estímulo. Dichas suspensiones se agregaron a cada pozo, respectivamente. El volumen final en cada pozo fue de 2 mL. Las células fueron incubadas durante 24 horas a 37°C y con 5% de CO₂.

Una vez transcurrido el tiempo correspondiente, a las células se les retiró el medio y se despegaron con 500 μ L de TrypLE™ Express Enzyme (1X) (Gibco™, #12604013) a temperatura ambiente. La suspensión celular se transfirió a un tubo de citometría y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 mL de buffer de fijación FCM 1X (900 μ l de FACs + 100 μ L de buffer de fijación 10X) (Santa Cruz Biotechnology, #sc-45063) durante 15 min en hielo. Al terminar la fijación, las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min a 4° C y el sobrenadante fue descartado. Se lavó dos veces con 500 μ L de PBS, centrifugando las células a 2000 rpm durante 5 min a 4° C y el sobrenadante fue descartado.

Para el control de autofluorescencia, las células se resuspendieron en 200 μ L de PBS frío, se añadieron 200 μ L de FACS *Flow* y se leyeron en el citómetro de flujo *LSRFortessa* (BD *Biosciences*).

Para las tinciones intracelulares de CTLA-4, una vez descartado el sobrenadante, las células se resuspendieron en 1 mL de buffer de permeabilización FCM (*Santa Cruz Biotechnology*, #sc-45063) y se incubaron en hielo durante 15 min. Una vez transcurrido ese tiempo, las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min a 4° C y el sobrenadante fue descartado.

Después, se lavaron las células dos veces con 1 mL de buffer de lavado FCM (*Santa Cruz Biotechnology*, #sc-45063), se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min a 4° C y el sobrenadante fue descartado.

La inmunotinción se realizó con anticuerpo monoclonal CTLA-4 (F-8) acoplado a Alexa Fluor® 488 (sc-376016 AF488, *Santa Cruz Biotechnology*) a una dilución de 1:200 en FACS *Flow* durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad.

Una vez terminado el tiempo de incubación, las células se lavaron dos veces con 1 mL de buffer de lavado FCM (*Santa Cruz Biotechnology*, #sc-45063), y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min a 4°C. Una vez descartado el sobrenadante del último lavado, se resuspendieron en 300 μ L de buffer de lavado y 200 μ L de FACS *Flow* y finalmente se leyeron en el citómetro de flujo *LSRFortessa* (BD *Biosciences*). Los resultados se analizaron con ayuda del software *FCS express V3*.

Resultados

Los resultados indicaron que IFN- γ que produce un aumento en la expresión de CTLA-4 y que la mejor concentración para que haya mayor número de células CTLA-4⁺ es a partir de 40 ng/ml (Figura 9). También se observó que la concentración utilizada de PMA/I induce la expresión de CTLA-4 a porcentajes comparables con las concentraciones utilizadas de 10 ng/mL y 20 ng/mL de IFN- γ .

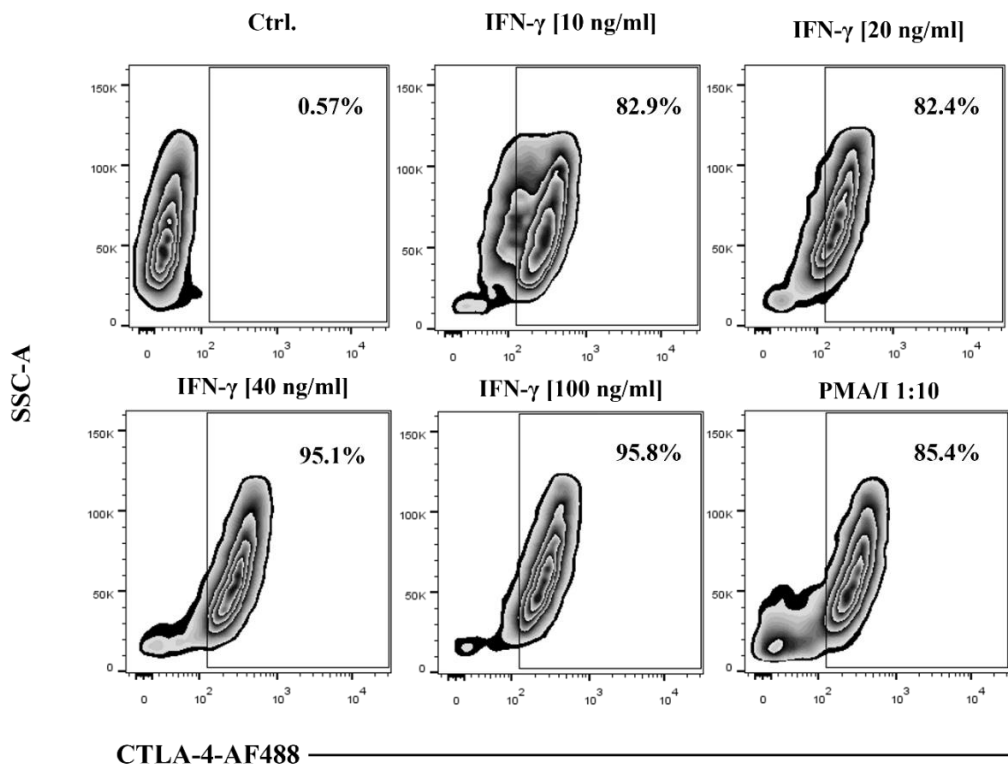


Figura 9. IFN- γ provoca el aumento de la expresión de CTLA-4 en A-375. La expresión total de CTLA-4 en células A-375 fijadas y permeabilizadas cultivadas en presencia o ausencia de IFN- γ a diversas concentraciones y de PMA/I [50 ng/mL/500 ng/mL] durante 24 h, teñidas con CTLA-4-AF488 y analizadas mediante citometría de flujo.

Este resultado coincide con el conocimiento sobre la regulación de la expresión de CTLA-4, el cual está basado en estudios de activación de células T *in vitro* en respuesta a estímulos no fisiológicos, como anti-CD28, anti-CD3,

PMA y ConA (Wang et al., 2001). Además, se conoce que, tanto PMA como la ionomicina inducen la expresión de CTLA-4 de superficie, siendo PMA el que causa el mayor efecto (Linsley et al., 1996). En conjunto, los resultados sugieren que la expresión de CTLA-4 en melanoma podría ser inducida de igual manera que en células T. Esto será tomado en cuenta para futuros experimentos.