



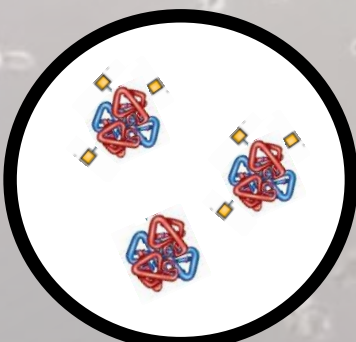
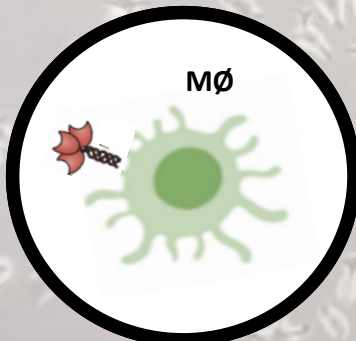
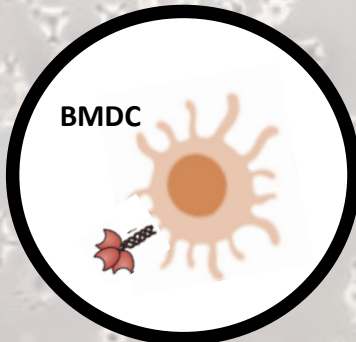
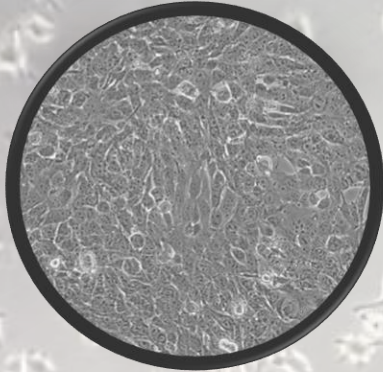
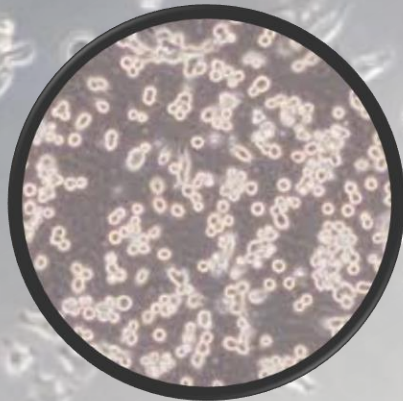
UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



Estudio de propiedades inmunomoduladoras del antígeno tumoral Tn



Tesina de la Licenciatura en Bioquímica
Santiago Antonio Rodríguez Zraquia

Tutora: Dra. Teresa Freire
Co-tutora: Lic. Valeria da Costa

Laboratorio de Inmunomodulación y Desarrollo de Vacunas
Departamento de Inmunobiología
Facultad de Medicina

Montevideo-Uruguay, 2019



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR fcien.edu.uy



Estudio de propiedades inmunomoduladoras del antígeno tumoral Tn

Tesina de la Licenciatura en Bioquímica

Santiago Antonio Rodríguez Zraquia

Tutora: Dra. Teresa Freire

Co-tutora: Lic. Valeria da Costa

Laboratorio de Inmunomodulación y Desarrollo de Vacunas

Departamento de Inmunobiología

Facultad de Medicina

Montevideo-Uruguay

2019

Índice

Lista de abreviaturas.....	4
Resumen	6
Introducción	8
• Cáncer en el Mundo y en Uruguay	8
• Glicosilación y Cáncer	12
• Antígeno Tn.....	14
• Sistema Inmune y Cáncer	16
• Macrófagos y células dendríticas en el microambiente tumoral.....	19
• Resistencia a drogas quimioterapéuticas por parte de las células tumorales.....	20
• Antecedentes Inmediatos a este trabajo.....	22
Hipótesis de Trabajo.....	25
Objetivos.....	25
• Objetivos generales.....	25
• Objetivos específicos	25
Materiales y Métodos.....	26
• Cultivo de células tumorales.....	26
• Cultivo de la línea de macrófagos RAW-264.7.....	26
• Generación de células dendríticas (BMDC)	27
• Ensayos de co-cultivos de células tumorales con células dendríticas o macrófagos	27
• Determinación de citoquinas por ELISA	28
• Citometría de Flujo.....	29
• Evaluación de secreción de proteínas al medio extracelular por parte de las células LL/2	29
• Cuantificación de Proteínas	30
• Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS/PAGE)	30
• Dot blot.....	32
• Ensayo de quimiosensibilidad <i>in vitro</i>	32
• Análisis estadísticos.....	33
Resultados.....	34
• Modulación de la activación de células dendríticas por células de cáncer de mama 4T1 Tn+ y Tn-	34
• Modulación de la activación de macrófagos por células de cáncer de mama 4T1 Tn+ y Tn-	38
• Modulación de la activación de BMDCs por células de cáncer de pulmón LL/2 Tn+ y Tn-	40

- Evaluación de la secreción de glicoproteínas por parte de las células LL/242
- Determinación de motivos carbohidratos en el medio condicionado45
- Evaluación de la quimiosensibilidad a drogas quimioterapéuticas.....46

Discusión y perspectivas..... 50

Conclusiones generales..... 57

Agradecimientos 58

Bibliografía..... 59

Lista de abreviaturas

APS-Persulfato de amonio

BCA-Ácido bicinconínico

BMDC-Células dendríticas derivadas de la médula ósea

BSA-Seroalbúmina bovina

ConA- Conavalina A

DAMP-Patrones moleculares asociados al daño

EGF-Factor epidérmico de crecimiento

ELISA-Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

FBS-Suero fetal bovino

GalNAc- N-Acetilgalactosamina

GALNT- Polipeptidil-N-Acetil-galactosamil-Transferasas

GM-CSF-Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

HPA- Helix pomatia aglutinin

IL-Interleuquina

MGL-Lectina de macrófagos específico para Gal/GalNAc

MHC-Complejo Mayor de Histocompatibilidad

ND-No determinado

NK-Asesinas naturales

OMS-Organización Mundial de la Salud

ON-Toda la noche

OPD-O-Phenylenediamina dihydrochlorido

OST-Oligosacárido transferasa

PBS-Buffer fosfato salino

SDS-Dodecilsulfato sódico

Ser-Serina

TEMED-Tetramethylethylenediamina

TGF- β -Factor de crecimiento tumoral beta

Th-Linfocito TCD4 colaborador

Thr-Treonina

TNF- α -Factor de necrosis tumoral alfa

VEGF- Factor de crecimiento endotelial vascular

Resumen

El cáncer es una enfermedad no transmisible la cual se estima que será la principal barrera para incrementar la expectativa de vida en todo el mundo para este siglo. Esto ha motivado intensas investigaciones en encontrar estrategias que permitan eliminar las células tumorales sin dañar los tejidos sanos. En ese sentido, la inmunoterapia es uno de los abordajes que ha contribuido y contribuye enormemente en este combate.

En el presente trabajo se evaluaron las propiedades inmunomoduladoras del antígeno Tn, las cuales están asociadas a la malignidad del tumor, así como a una menor supervivencia y menor tiempo libre de enfermedad. De manera que el antígeno Tn juega un rol en la progresión tumoral y fue el propósito del presente trabajo arrojar luz en descifrar los cambios moleculares y celulares que éste realiza sobre la respuesta inmune frente a las células tumorales. Para esto, se evaluó el comportamiento tanto de células dendríticas como de macrófagos (células claves del sistema inmune) frente a células tumorales (de pulmón y de mama) Tn+ y Tn- y así se pudieron investigar los cambios que son atribuibles a la presencia de Tn en las células tumorales. En particular, se evaluaron mediante ELISA los niveles de tres tipos de citoquinas secretadas (dos de ellas pro-inflamatorias y una anti-inflamatoria) por macrófagos RAW 264.7 y células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDC). También se evaluó la expresión de marcadores de activación de superficie celular, de dichas células mediante citometría de flujo.

Por otro lado, se evaluó la presencia de proteínas secretadas por las células tumorales en el medio extracelular con la idea de determinar un eventual rol inmunomodulador de éstas sobre las células dendríticas y macrófagos.

También se evaluó la quimiosensibilidad de las células tumorales trabajadas, con el propósito de evaluar si la presencia de Tn en éstas, provocaba un comportamiento distinto frente a las drogas quimioterapéuticas.

Nuestros resultados mostraron que las líneas tumorales Tn+ tanto del modelo de cáncer de pulmón como el de mama, poseen capacidad diferente de modulación sobre la activación de células dendríticas y macrófagos. Por otro lado, frente a la incubación con drogas quimioterapéuticas, se observó un comportamiento diferencial para las células de cáncer de mama 4T1 Tn+, mostrando un comportamiento que indica proliferación frente a las drogas Paclitaxel y Gemcitabina.

Con el trabajo realizado y los resultados obtenidos, se puede afirmar que esta Tesina de Grado contribuyó al estudio de los mecanismo moleculares y celulares que median las células tumorales expresando el antígeno Tn.

Introducción

- **Cáncer en el Mundo y en Uruguay**

En el ámbito de la salud mundial, las enfermedades no transmisibles en su conjunto, son responsables de la mayoría de las muertes globales, y el cáncer es una de ellas. En 2015 fue responsable de 8,8 millones de muertes, y es la primer o segunda causa de muerte antes de los 70 años de edad, en 91 de 172 países (Figura 1) (Bray et al. 2018; World Health Organization 2015). En perspectiva, se espera que el cáncer sea la principal barrera para incrementar la expectativa de vida en todo el mundo en este siglo (Bray et al. 2018).

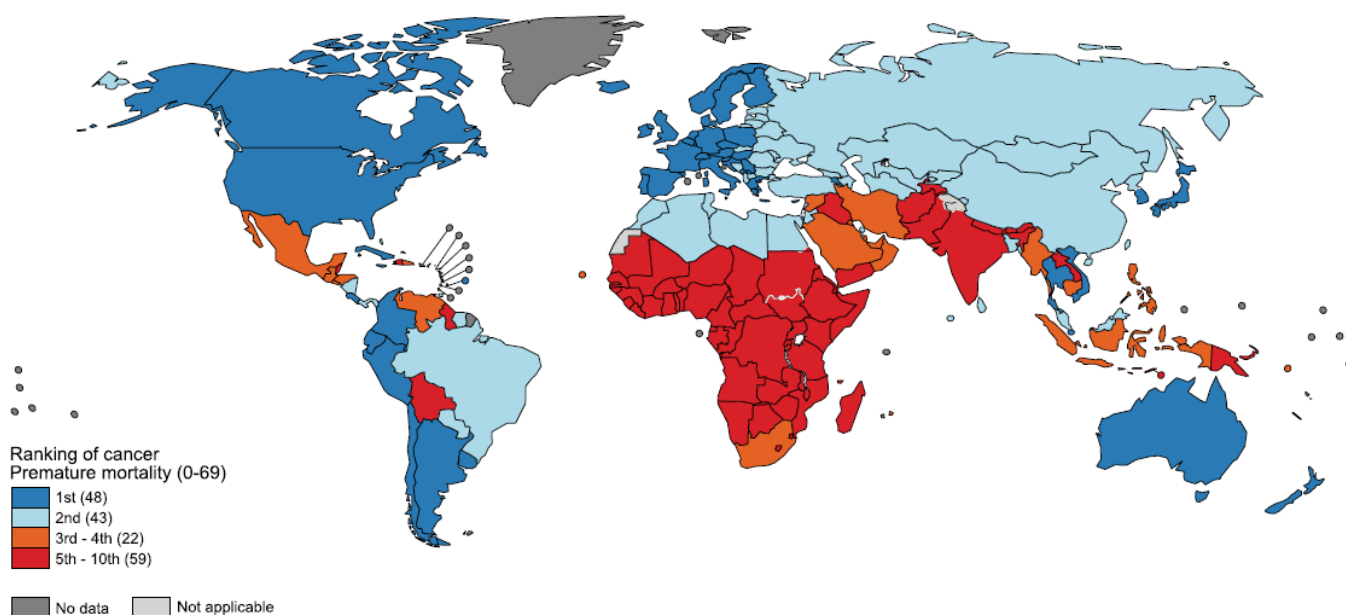


Figura 1: Índice de mortalidad prematura por cáncer en el mundo. Se indica según código de colores la mortalidad prematura (0-69 años) por cáncer en el mundo. Modificado de Bray et al. (2018)

Los cinco tipos de cáncer con mayor mortalidad, ordenadas de mayor a menor, son: el cáncer de pulmón, hepático, colorrectal, gástrico y de mama (World Health Organization 2015). En particular, el cáncer de pulmón es el tipo de cáncer más frecuente y el que presenta mayor mortalidad en hombres. Por otro lado, en mujeres, el tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado es el cáncer de mama, el cual también está primero en cuanto a mortalidad, seguido por el cáncer de pulmón (Bray et al. 2018).

Estos órdenes varían sustancialmente a lo largo de los distintos países, así como también dentro de un mismo país, dependiendo, entre otras cosas, del desarrollo económico asociado a factores del estilo de vida y social (Bray et al. 2018). En ese sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor de la tercera parte de las muertes causadas por cáncer, se deben a cinco factores de riesgo relacionados al estilo de vida. Estos son: el elevado índice de masa corporal, la ingesta reducida de frutas y verduras, el sedentarismo, el consumo de tabaco y alcohol.

Según el Ministerio de Salud Pública, en Uruguay el cáncer ocupa la segunda causa de muerte luego de las enfermedades cardiovasculares, con un 24,6% de los fallecimientos en 2017. En el período 2011-2015, el tipo de cáncer con mayor incidencia en hombres, fue el de próstata, seguido del de pulmón y colorrectal. En mortalidad el primero fue el cáncer de pulmón, luego le siguió el cáncer colorrectal y en tercer lugar el de próstata. En mujeres, tanto en incidencia como en mortalidad, el cáncer líder fue el de mama, seguido por el colorrectal. El tercer lugar en incidencia lo ocupa el cáncer de cuello de útero, y en cuanto a mortalidad el de pulmón (Ministerio de Salud Pública 2019).

- **Características de las células tumorales**

Normalmente, las células humanas crecen y se dividen para formar nuevas células en la medida que el cuerpo lo necesite. Por ejemplo, cuando envejecen o dañan, son reemplazadas por células nuevas, manteniéndose así un equilibrio entre proliferación y muerte. Sin embargo, en el cáncer, este equilibrio no se mantiene (“National Cancer Institute” 2019). Según Hanahan y Weinberg (2011) una célula normal para evolucionar a un estado neoplásico, debe ir adquiriendo progresivamente ciertos rasgos distintivos o “hallmarks” (como se esquematiza en la Figura 2) que les permitirán luego volverse tumorogénicas y en última instancia malignas.

Es así que una célula normal para poder volverse tumoral, debe ser capaz de mantener el potencial de replicarse, para así poder dividirse indefinidamente y generar eventualmente tumores macroscópicos. En condiciones normales, las células se replican un número limitado de veces (si es que lo hacen) y luego entran en un estado el cual recibe el nombre de senescencia. En este estado, la célula sigue siendo viable,

pero deja de replicarse. Estudios *in vitro* han demostrado que la mayor parte de células que llegan a superar esta etapa de senescencia, terminan muriendo. Solamente en muy pocos casos, algunas células logran superar estas dos barreras y se dice que se vuelven inmortales (Hanahan y Weinberg 2011).

Por otro lado, para que las células puedan seguir replicándose, necesitan recibir constantemente estímulos (Hanahan y Weinberg 2011). Concordantemente, las células tumorales se caracterizan por poder adquirir la capacidad de generar ellas mismas las señales de crecimiento que necesitan para proliferar, y esto lo pueden hacer de diversas maneras. Por ejemplo, pueden producir factores de crecimiento, que pueden resultar en una estimulación autócrina. Alternativamente, las células cancerosas pueden enviar señales para estimular células vecinas normales que produzcan los factores de crecimiento que éstas necesitan (Hanahan y Weinberg 2011).

Por otra parte, las células normales poseen mecanismos de autorregulación, que previenen del crecimiento y la replicación celular indefinida. A diferencia de las células normales, las células tumorales son capaces de evadir dichos mecanismos supresores del crecimiento. Por ejemplo, mientras que la proliferación de las células normales es inhibida por el contacto con otras células, como un mecanismo de autorregulación de la proliferación, este proceso no limita la proliferación de células tumorales (Hanahan y Weinberg 2011).

Por otro lado, debido a su alta tasa proliferativa, las células tumorales tienen una alta demanda de nutrientes. Por esta razón desarrollan una red vascular (proceso que recibe el nombre de angiogénesis), tanto para la llegada de nutrientes y oxígeno al sitio de proliferación, como para contar con una vía de evacuación de los desechos metabólicos y el dióxido de carbono (Folkman 2002; Hanahan y Weinberg 2011).

Por otra parte, para poder hacer frente a los requerimientos de un crecimiento rápido, las células tumorales, sufren adaptaciones en su metabolismo energético que les permiten sobrevivir en condiciones adversas, como lo son, la falta de nutrientes y niveles bajos de oxígeno (Thakur y Chen 2019). En ese sentido, se ha asociado recientemente, a las células tumorales con una desregulación en su energética celular, como una característica distintiva de las mismas (Hanahan y Weinberg 2011). Uno de los cambios por ejemplo, inducido por la hipoxia en el microambiente tumoral, es la estabilización del factor inducible por hipoxia 1α (HIF1 α), el cual activa la expresión de

genes que codifican transportadores de glucosa y varias enzimas glucolíticas, como glicosiltransferasas, modificando por ejemplo, el metabolismo glucolítico (Rodríguez, Schetters, y Van Kooyk 2018; Brihimi-Horn y Pouysségur 2009).

Las células tumorales que dan lugar a la aparición de tumores malignos poseen la capacidad de desarrollar mecanismos de invasión y de diseminación, promoviendo la aparición de metástasis (Hanahan y Weinberg 2011; Bacac and Stamenkovic 2008) siendo la principal causa de muerte entre los pacientes con cáncer (Bacac y Stamenkovic 2008).

Por último, otro de los rasgos distintivos de las células tumorales que se han asociado últimamente, es la evasión del sistema inmune, de lo cual se hablará en profundidad más adelante (Hanahan y Weinberg 2011).

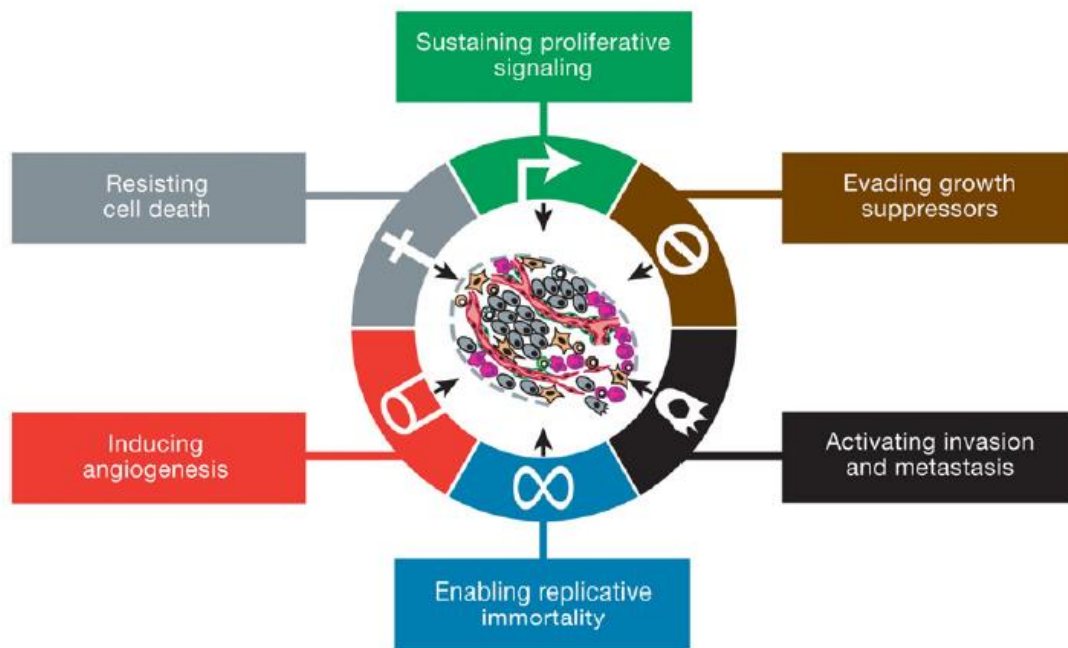


Figura 2: Principales características distintivas de las células cancerígenas/tumorales.

Las células tumorales adquieren determinadas capacidades funcionales durante la carcinogénesis. Entre ellas se encuentran: resistencia a la muerte, autosuficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad a señales supresoras del crecimiento, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión activa y metástasis. Modificado de Hanahan y Weinberg (2011).

- **Glicosilación y Cáncer**

El cáncer continúa siendo difícil de diagnosticar y de tratar, porque entre otras cosas, es una patología que involucra un amplio rango de procesos celulares que cómo se comentó previamente, se encuentran desregulados. Por tal motivo, identificar las alteraciones claves específicas de los tejidos neoplásicos y entender los mecanismos subyacentes permitirán eventualmente detectar en mejor tiempo y forma la enfermedad (Chia, Goh, y Bard 2016). En ese sentido, una de las alteraciones presentes en las células tumorales, es su glicosilación en la superficie celular. Las células tumorales presentan un glicofenotipo diferente al de las células normales (Rodríguez, Schetters, y Van Kooyk 2018).

La glicosilación, se encuentra entre las modificaciones post-transcripcionales más complejas y es también, la más frecuente. Es un proceso altamente regulado, el cual responde rápidamente a los cambios fisiológicos (Chia, Goh, y Bard 2016; van Vliet et al. 2005).

En proteínas de mamíferos, podemos encontrar dos tipos principales de glicosilación: N-glicosilación y O-glicosilación. La N-glicosilación comienza en el retículo endoplásmico, con la transferencia de un precursor formado por el lípido Dolicol-fosfato y por los glicanos N-acetilglucosamina, Manosa y Glucosa, que conforman una estructura de 14 azúcares. Luego esta estructura se une a residuos de Asparagina por la enzima oligosacárido transferasa (OST), para luego sufrir modificaciones como parte de un proceso de control de calidad. Posteriormente, la glicoproteína en cuestión es transportada al Aparato de Golgi para la modificación de glicanos específicos (Reily et al. 2019).

Al contrario de la N-glicosilación, la O-glicosilación es iniciada en el aparato de Golgi y prescinde de un molde para la adición de glicanos (Peixoto et al. 2019; Reily et al. 2019). De hecho, los monosacáridos son agregados de forma secuencial por la acción de distintas glicosiltransferasas (como se detalla en la Figura 3) a partir de un aminoácido hidroxilado, como lo son los residuos de Serina y Treonina principalmente. Los distintos glicanos son añadidos a medida que la proteína se mueve a través del cis-, medial- y trans-Golgi (Reily et al. 2019).

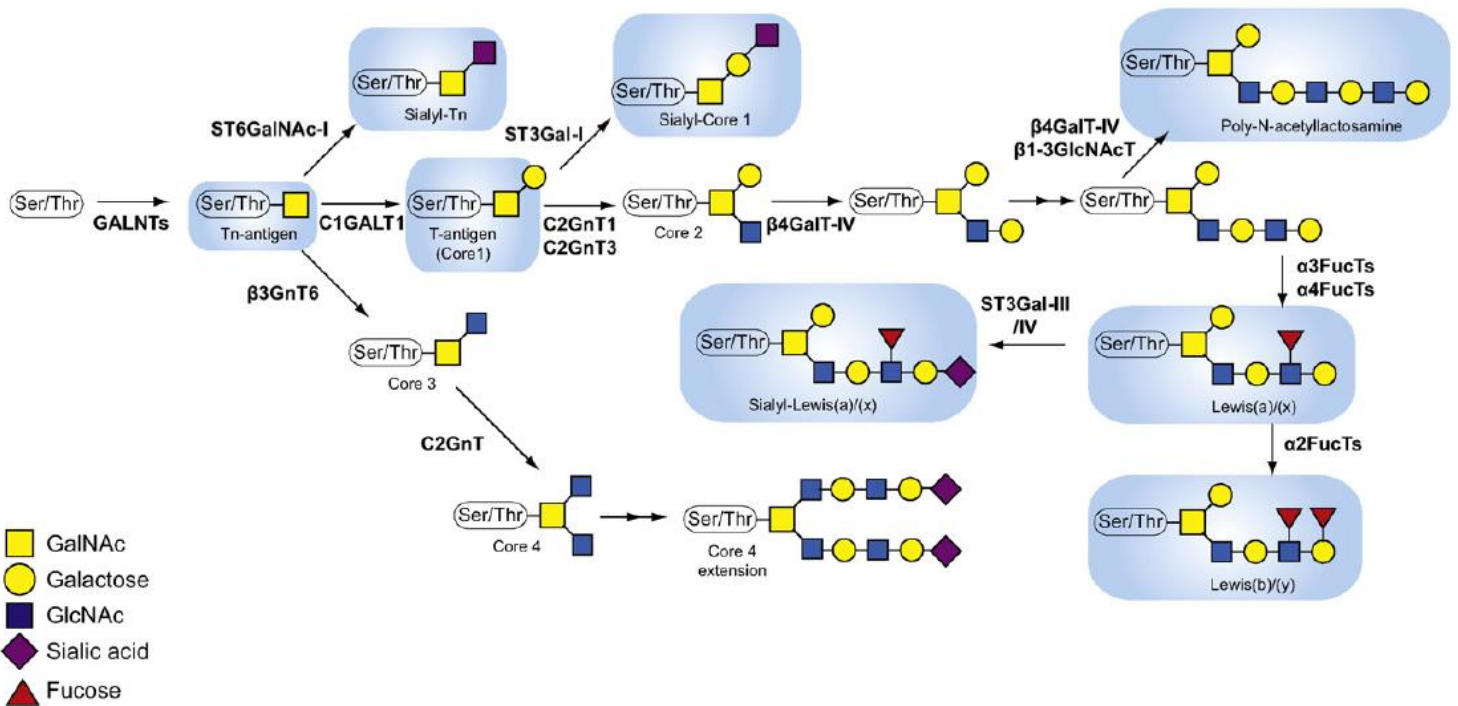


Figura 3: Proceso de O-glicosilación de tipo mucina. Se muestran las estructuras principales observadas durante el proceso de O-glicosilación y las enzimas involucradas (GALNT: N-acetilgalactosamiltransferasa, ST6GalNAc-I: N-acetilgalactosamina α 2-6-sialiltransferasa, C1GALT1: N-acetilgalactosamina 3-beta-galactosiltransferasa 1, ST3Gal-I: β -galactosido α -2,3-sialiltransferasa 1, C2GnT1: glucosamil (N-acetil) transferasa 1, C2GnT3: β -1,3-galactosil-O-glicosil-glicoproteína β -1,6-N-acetilglucosamiltransferasa 4, β 4GalT-IV: β -1, 4-Galactosiltransferasa 4, β 1-GlcNAcT: β 1-3-N-Acetilglucosamiltransferasa, α 2FucTs: α 2-fucosiltransferasas, α 3FucTs: α 3-fucosiltransferasas, α 4FucTs: α 4-fucosiltransferasas, ST3Gal-III : β -galactosido α 2,3-sialiltransferasa 3, ST3Gal-IV: β -galactosido α 2,3-sialiltransferasa 4, β 3GnT6 : β -1,3-N-acetilglucosamiltransferasa 6, C2GnT : β -1,6-N-acetilglucosamiltransferasa). Los recuadros celestes indican las estructuras asociadas al cáncer. Extraído de Chia, Goh, y Bard (2016)

Muchos de los glicanos y glicoconjugados se encuentran en la superficie celular, conformando lo que se conoce como el glicocálix de una célula (Peixoto et al. 2019; Rodrigues et al. 2018). Esta localización clave explica su papel en el reconocimiento y en la interacción con otras células y el ambiente extracelular, mediando procesos como la angiogénesis, la metástasis, el contacto célula-célula, la transición epitelio-mesenquimal en las células tumorales e incluso la interacción con el microambiente tumoral, el cual juega un papel determinante en la progresión del cáncer (Chia, Goh y Bard 2016; Rodrigues et al. 2018). Por ello, además de asociarse con el cáncer, la

alteración del proceso de glicosilación también ha sido identificado en inmunodeficiencias y desórdenes congénitos (Pinho y Reis 2015; Reis et al. 2010; Freeze y Aebi 2005; Dube y Bertozzi 2005).

El antígeno Tn es uno de muchos glicanos que se encuentran asociados al cáncer. Otros ejemplos son el antígeno de Lewis, glicanos sialilados, como el antígeno sialil-Tn, entre otros (Rodríguez, Schetters y Van Kooyk 2018). La aparición de estos antígenos se debe a que el proceso de transformación maligna viene acompañado de cambios en la expresión de genes involucrados en la síntesis de glicanos, como por ejemplo en los genes que codifican para las glicosiltransferasas y las glicosidasas, así como también en los genes que codifican para los factores de transcripción que dirigen la transcripción de los genes de dichas enzimas. Cambios epigenéticos también están involucrados en dicha desregulación (Rodríguez, Schetters y Van Kooyk 2018).

- **Antígeno Tn**

Varios O-glicanos pueden unirse a Serina o Treonina, donde la unión de GalNAc representa el tipo de O-glicosilación más común en células de mamíferos (Chia, Goh, and Bard 2016). Esta adición de GalNAc a una Serina o Treonina mediante un enlace tipo alfa conforma lo que se conoce como el antígeno Tn (Figura 4), uno de los glicanos más específicos del cáncer de origen epitelial. Fue descubierto en 1957, sin embargo, la conexión entre el antígeno Tn y el cáncer no fue establecida hasta 1969, donde a partir de estudios subsiguientes se demostró que Tn se expresa de forma aumentada en alrededor del 90% de los tumores de mama (Chia, Goh y Bard 2016). Hoy en día se sabe que Tn se expresa entre un 70 y un 90% de los tumores sólidos humanos, como ha de ser mama, colon, pulmón, vejiga, cervix, ovario, estómago y próstata, mientras que en los tejidos normales su expresión es baja o nula (Chia, Goh y Bard 2016).

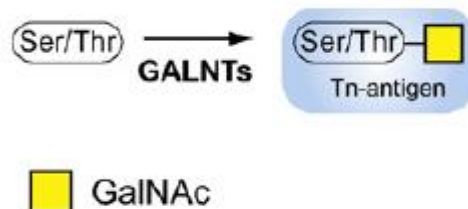


Figura 4: Síntesis del antígeno Tn. El antígeno Tn es uno de los glicanos más específicos del cáncer de origen epitelial. Modificado de Chia et al., (2016).

El antígeno Tn es sintetizado por una familia de enzimas (en humanos se han identificado al menos 20 isoformas) llamadas polipeptidil-N-Acetil-galactosamil-Transferasas (GALNTs por sus siglas en inglés), las cuales se localizan de forma transmembrana en el aparato de Golgi. Estas enzimas catalizan la adición de un monosacárido GalNAc desde UDP-GalNAc al grupo hidroxilo de residuos Ser/Thr. Este paso es el primero en una cascada del proceso de O-glicosilación, que posteriormente dará lugar a los O-glicanos extendidos que se encuentran en tejidos normales (Fu et al. 2016). La presencia de Tn en un contexto de superficie celular, implica por tanto un bloqueo en el proceso de O-glicosilación. La enzima β 1-3-galactosiltransferasa o también llamada T-sintasa es la enzima encargada de añadir una galactosa al antígeno Tn , para formar el antígeno T o también llamado TF, y continuar así con la elongación del core 1 (Fu et al. 2016) (Figura 3). Esta enzima necesita también de la chaperona COSMC, para plegarse correctamente y ser activa (Fu et al. 2016).

Además de ser un marcador de malignidad, la expresión del antígeno Tn en el tumor se ha visto asociada con menor supervivencia y menor tiempo libre de enfermedad (Nogimori et al. 2016). Por otro lado, estudios recientes, indican que la expresión de Tn en los tumores promueve la invasividad de las células tumorales y altera la inmunogenicidad de los antígenos tumorales (Lenos et al. 2015). Asimismo, se ha visto que la presencia de Tn está asociada con metástasis (Zhang et al. 1998) Esto podría deberse a que a mayores niveles del antígeno Tn se inhibe más la unión celular, lo que se asocia, con la migración de las células y formación de metástasis, generando una enfermedad más agresiva (Freire y Osinaga 2003).

Por último, desde el principio de este siglo, se ha demostrado que existe un incremento de los niveles del antígeno Tn en el suero varias semanas antes del desarrollo tumoral, indicando que este antígeno podría constituir un biomarcador temprano de malignidad (Babino et al. 2000).

- **Sistema Inmune y Cáncer**

A pesar de que las células tumorales tienen su origen a partir de células propias, son capaces de inducir una respuesta inmune. Existe creciente evidencia de que el sistema inmune puede tener un papel paradójico en esta respuesta frente a los tumores, pudiendo no sólo prevenir o controlar el crecimiento tumoral, sino también facilitar la transformación celular. Esta doble acción del sistema inmune está eventualmente determinada por los distintos sucesos que se van dando de manera temporal en la formación del tumor, los componentes particulares involucrados en cada proceso, así como la naturaleza de los antígenos expresados en cada célula transformada (Mittal et al. 2014).

En los últimos años ha venido tomando gran fuerza la teoría de la Inmunoedición, la cual se ilustra en la Figura 5. Esta propone que el sistema inmune interacciona y moldea el crecimiento tumoral. En una primera instancia, se da un proceso de reconocimiento de las células tumorales y su posterior eliminación por parte del sistema inmune (Mittal et al. 2014). El mecanismo por el cual el sistema inmune identifica las células transformadas no está claramente establecido. Sin embargo, hay factores que contribuyen a dicha alerta, como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), los cuales son liberados por las células tumorales que están muriendo o por los tejidos dañados debido a la invasividad de los tumores sólidos en crecimiento. Por otro lado, moléculas de estrés celular son expresadas frecuentemente en la superficie celular de las células tumorales. De esta manera, el sistema inmune reconoce la existencia de células tumorales y responde activando las células del sistema inmune innato, las cuales liberan citoquinas pro-inflamatorias que favorecen y determinan el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa (Schreiber, Old, y Smyth 2011). Sin embargo, en la mayoría de los casos, el sistema inmune no logra eliminar toda la población de células tumorales. Estas células entran entonces en una fase de equilibrio, donde el sistema inmune previene el crecimiento tumoral, pero no logra eliminar todas las células tumorales. De forma que queda una población de células tumorales que logra evadir las acciones efectoras del sistema inmune, y por tanto se dice que el sistema inmune moldea de alguna manera al tumor, editando así su inmunogenicidad. (Schreiber, Old, y Smyth 2011). Este último punto se comprobó cuando se determinó que los tumores generados en ratones carentes de un sistema inmune óptimo, presentaban tumores más inmunogénicos que aquellos tumores inducidos en ratones inmunocompetentes. De manera que el sistema inmune ejerce

una presión selectiva y por tanto determina así la población de células que escapan a sus acciones efectoras (Dunn et al. 2002; Shankaran et al. 2001).

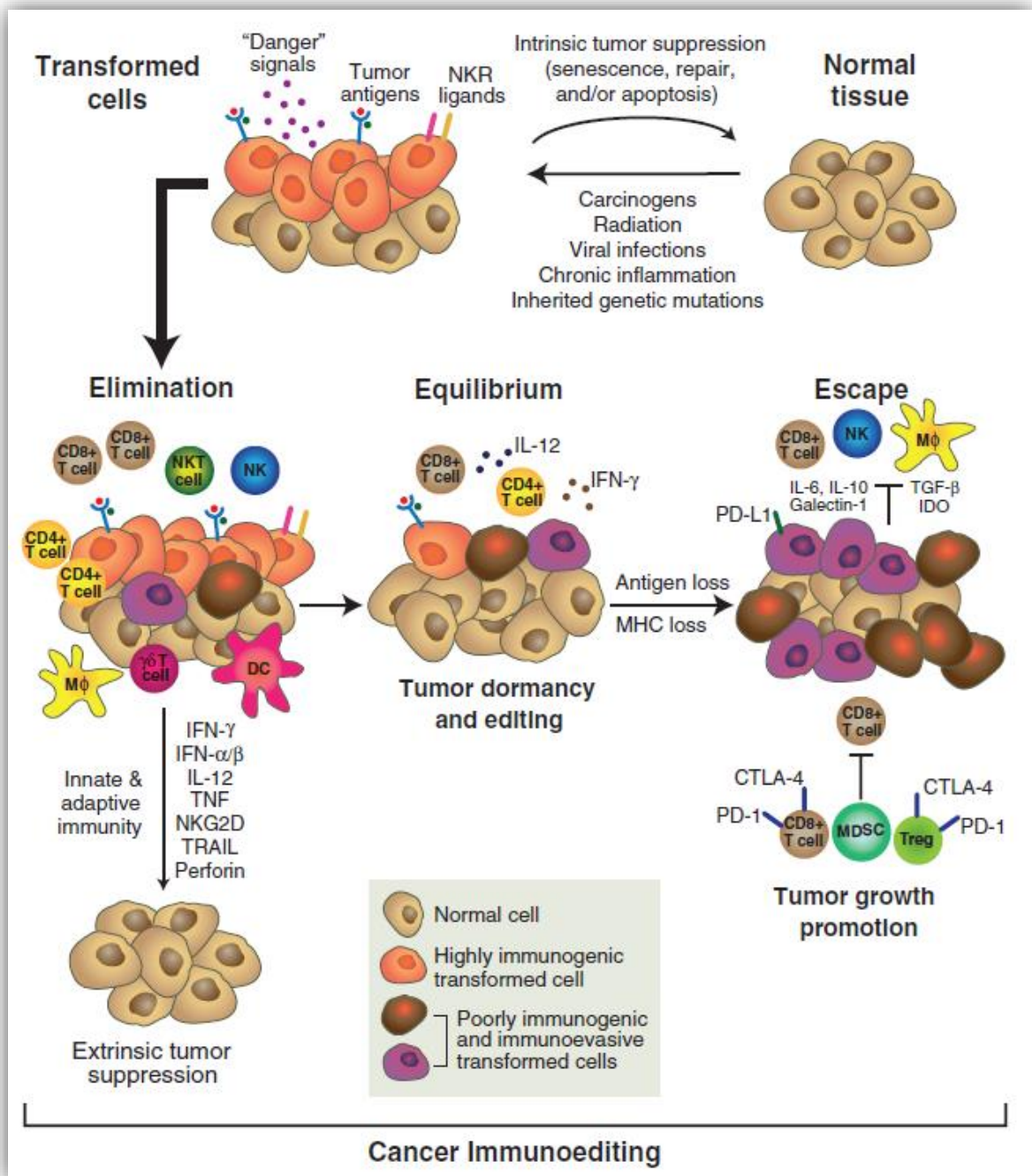


Figura 5: Hipótesis de la inmunomodulación en el cáncer. Se muestra como el sistema inmune moldea la población de células tumorales y por tanto ejerce una presión selectiva en este. Extraído de Schreiber et al. (2011)

Las células que hayan adquirido la capacidad de superar las barreras que le impone el sistema inmune, logran crecer progresivamente en tumores visibles, gracias a su habilidad de evadir la respuesta inmune y a la creación de un ambiente inmunosupresor que regula la acción del sistema inmune (Schreiber, Old, y Smyth 2011).

Por lo dicho anteriormente, no es sorprendente que las células tumorales, expresen de forma frecuente moléculas que inhiben las acciones anti-tumorales de una respuesta inmune (Rodríguez, Schetters, y Van Kooyk 2018). Entre estas moléculas se encuentran ciertos glicanos que pueden ser censados por el sistema inmune mediante receptores llamados lectinas, que pueden modular la respuesta inmune (Rodríguez, Schetters, y Van Kooyk 2018). Existen lectinas solubles, como las galectinas, que pueden ser secretadas por un amplio rango de tumores y son capaces de afectar la función efectora de las células T y de modular la actividad de las células asesinas naturales o NK (Natural Killer, por sus siglas en inglés). Tanto los linfocitos T como las células NK son células claves en la respuesta anti-tumoral (Glasner et al. 2018; Gonzalez, Hagerling, y Werb 2018). De manera que la secreción de galectinas por los tumores se considera un predictor de una respuesta inmune supresora en el microambiente tumoral (Rodríguez, Schetters, y Van Kooyk 2018).

Por otro lado, también existen receptores expresados en la superficie de los leucocitos de estirpe mieloide, denominados receptores lectina de tipo C (o CLR), que pueden modular la respuesta inmune y desencadenar una numerosa variedad de respuestas celulares e inmunológicas críticas para regular y controlar adecuadamente procesos como: infecciones, homeostasis, autoinmunidad, alergia y cáncer (Van Kooyk y Geijtenbeek 2003; Zelensky y Gready 2005).

En particular, el receptor MGL (Macrophage galactose type C-type lectin por sus siglas en inglés), se expresa en las células dendríticas y en macrófagos alternativamente activados, y tiene un papel en la regulación inmune (Higashi et al. 2002; Raes et al. 2005; van Vliet et al. 2006). Mientras que su expresión se vuelve negativa luego de la maduración de la célula dendrítica, es sobre-expresado por células dendríticas tolerogénicas (van Vliet et al. 2006). El receptor MGL, es el único CLR capaz de reconocer α o β N-acetilgalactosaminas (GalNAc) terminales (van Vliet et al. 2005; Mortezaei et al. 2013) incluyendo al antígeno Tn.

- **Macrófagos y células dendríticas en el microambiente tumoral**

El microambiente tumoral es complejo y está continuamente evolucionando, de manera que constituye un proceso dinámico (Schreiber, Old, y Smyth 2011). Está compuesto, además de las células tumorales, por diversos tipos celulares, como las células estromales, fibroblastos, células endoteliales y por células del sistema inmune, incluyendo macrófagos y células dendríticas que pueden expresar el receptor MGL.

Los macrófagos participan en la respuesta inmune de varias maneras. Realizan fagocitosis, pueden actuar como células presentadoras de antígeno y también poseen un papel en la reparación de tejidos así como en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica (Hinshaw y Shevde 2019). Estas células poseen una gran plasticidad celular y pueden polarizarse principalmente hacia dos perfiles: macrófagos M1 o clásicamente activados y macrófagos M2 o alternativamente activados (Ostuni et al. 2015). La clasificación M1-M2 hace referencia a que pueden favorecer una respuesta Th1 o Th2 respectivamente. Los macrófagos de tipo M1 juegan un papel crítico en lo que respecta a las defensas innatas del hospedero y también son responsables de eliminar a las células tumorales. Estas acciones son mediadas a través de la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, así como mediante la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Jeannin et al. 2018). Contrariamente, los macrófagos de tipo M2 tienen un perfil inmunoregulador, ya que, son productores de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10, TGF- β así como Th2 como la IL-13. También participan en los procesos de reparación de tejidos y en la inmunidad humoral. Por tanto, los macrófagos de tipo M1 son considerados anti-tumorales, mientras que los de tipo 2 tienen un perfil pro-tumoral (Sica et al. 2006).

De hecho, los macrófagos pueden modular la capacidad metastásica del tumor, a través de la generación de factores de crecimiento, como por ejemplo miembros de la familia de factores de crecimiento epidérmico (EGF) o el factor de crecimiento de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) (Goswami et al. 2005; Wyckoff et al. 2004; Chen et al. 2019). En este sentido, en ciertos tipos de cáncer como cáncer de mama, estómago, pulmón, entre otros, la alta infiltración de macrófagos en el tumor se correlaciona con un pronóstico negativo (Cardoso et al. 2014; Wang et al. 2018; Zhao et al. 2017).

Otro tipo de célula clave en la inmunidad innata, que participa en la respuesta frente a células tumorales, es la célula dendrítica. La célula dendrítica es considerada como el nexo entre la inmunidad innata y la adaptativa. Funcionan como células presentadoras de antígeno al igual que los macrófagos y los linfocitos B, pero a diferencia de éstos, presentan antígenos a los linfocitos T vírgenes, (Hinshaw y Shevde 2019; Fucikova et al. 2019). Al igual que los macrófagos, son células plásticas y pueden presentar un perfil más inmunosupresor o contrariamente un perfil más inmunogénico, dependiendo de las señales recibidas por el ambiente circundante (Hinshaw y Shevde 2019). En el contexto del cáncer, las células dendríticas se denominan células dendríticas infiltradas en tumor, que suelen ser en su mayoría inmunosupresoras o tolerogénicas (Hinshaw and Shevde 2019). Esta función es determinada por los factores presentes en el microambiente tumoral, como citoquinas IL-10, TGF- β y otros factores como el factor de crecimiento endotelial y vascular (VEGF) o prostaglandina E2, entre otros. Estos mediadores no sólo suprimen el desarrollo de una respuesta Th1 anti-tumoral, sino que además favorecen una respuesta de tipo Th2 y T reguladora (Schreiber, Old y Smyth 2011).

- **Resistencia a drogas quimioterapéuticas por parte de las células tumorales**

En la terapia contra el cáncer, la resistencia a las drogas utilizadas en quimioterapia continúa siendo la principal limitante en alcanzar la cura de los pacientes (Vasan, Baselga y Hyman 2019). La resistencia a las drogas puede ser clasificada en intrínseca o adquirida durante y/o posteriormente al tratamiento. La resistencia intrínseca se refiere a que las células tumorales presentan ciertos rasgos que las hacen resistentes a los efectos dañinos causados por la droga (Wijdeven et al. 2016). Sin embargo, en la práctica muchos tumores son o se convierten resistentes combinando factores de la resistencia intrínseca y adquirida (Vasan, Baselga y Hyman 2019). Entre los principales factores que determinan la resistencia a las drogas, se encuentran la carga tumoral, su cinética de crecimiento, la heterogeneidad del tumor, barreras físicas, el propio sistema inmune, el microambiente tumoral, mutaciones en ciertos oncogenes y la propia presión selectiva que se ejerce por el uso de drogas en la terapia anti-tumoral (Vasan, Baselga y Hyman 2019).

Existen distintas clases de agentes quimioterapéuticos, entre los cuales podemos distinguir, platinos, antimetabolitos, agentes antimitóticos, inhibidores de topoisomerasa, agentes alquilantes, entre otros.

Profundizando en los agentes quimioterapéuticos de interés, los platinos, como el Cisplatino, basan su mecanismo de citotoxicidad en reaccionar con ciertas estructuras intracelulares, provocando inter e intra-cruzamientos de las cadenas de ADN, lo que lleva al bloqueo del crecimiento, senescencia y apoptosis. Las células tumorales son más susceptibles que las células normales, debido a que crecen más rápido y además suelen presentar defectos en su maquinaria de reparación del ADN (Wijdeven et al. 2016).

Los antimetabolitos, como el 5-Fluorouracilo o la Gemcitabina, inhiben la formación de los nucleótidos, bloqueando de forma efectiva la replicación del ADN en las células altamente proliferantes. Estas drogas pueden tanto imitar enzimas esenciales para la biosíntesis de nucleótidos, como imitar los nucleótidos de ADN o ARN pero no siendo funcionales, causando la falla en la replicación e induciendo la muerte (Wijdeven et al. 2016).

Por último, dentro de los agentes antimetabólicos, encontramos agentes que atacan a los microtúbulos, los cuales son esenciales para la replicación celular. Participan en la estructura del citoesqueleto, señalización, transporte y en la segregación de los cromosomas en la división celular. De manera, que las células en división son afectadas enormemente por perturbaciones en la dinámica de los microtúbulos. El Paclitaxel es un ejemplo de droga desestabilizante de microtúbulos (Wijdeven et al. 2016).

Uno de los tipos de cáncer resistente a las drogas quimioterapéuticas, es el cáncer de mama triple negativo, el cual se caracteriza por su progresión hacia la metástasis, y por tanto a un mal pronóstico, teniendo menor supervivencia global en comparación con los otros tipos de cáncer de mama. El cáncer de mama triple negativo, representa entre el 15 y 20% de los cánceres de mama, y no hay hasta la fecha terapias aprobadas para el mismo. Este subtipo de cáncer es resistente a la terapia dado que no presenta las moléculas blanco que son necesarias para que las drogas quimioterapéuticas actúen adecuadamente. (Park, Choi y Nam 2019). Aunque muchos casos de cáncer de mama triple negativo en una primera etapa, son altamente sensibles a la quimioterapia, rápidamente generan resistencia, lo que lleva a una metástasis letal (Garrido-Castro, Lin y Polyak 2019).

Diferentes mecanismos moleculares han sido asociados con la resistencia a las drogas quimioterapéuticas. Por ejemplo, en etapas avanzadas del cáncer, así como en el proceso de transición epitelio-mesenchimal se genera resistencia en múltiples tipos de cáncer (Samanta et al. 2014; Lee et al. 2019). Además, la hipoxia y las especies

reactivas del oxígeno en las células cancerígenas mejoran su capacidad de sobrevivir, lo cual resulta en resistencia a radio y quimioterapia (Schito y Semenza 2016; Michiels 2004)

Interesantemente, la O-glicosilación de mucinas en las células cancerosas, lleva a la acumulación del antígeno Tn, el cual también promueve la quimioresistencia (Schito y Semenza 2016; Michiels 2004; Liu et al. 2018). Además, la sobreexpresión de las glicosiltransferasas que median la síntesis del antígeno Tn (GALNT3/GALNT6) ha sido también asociada con quimioresistencia en cáncer de colon y de ovario (Liu et al. 2018; Lin et al. 2017). Recientemente, la sobreexpresión del antígeno Tn en las células cancerosas se ha asociado con resistencia a la apoptosis y a la quimioterapia (Reynolds et al. 2019).

- **Antecedentes Inmediatos a este trabajo**

Como se expuso previamente, dadas las evidencias de trabajos, resulta pertinente evaluar el papel de Tn en la interacción del sistema inmune con la célula tumoral. Para ello, en el Laboratorio de Inmunomodulación y Desarrollo de Vacunas, del Departamento de Inmunobiología de la Facultad de Medicina (UdelaR) se generaron líneas Tn+ y Tn- a partir de dos líneas tumorales murinas, LL/2 de cáncer de pulmón y 4T1, de cáncer de mama (Figuras 6 a 8). Esto se realizó usando la tecnología Crispr/Cas9, dirigido contra la chaperona Cosmc, para generar *knock-out* de la misma y promover el bloqueo del proceso de O-glicosilación. Las células fueron seleccionadas utilizando como herramienta el anticuerpo 83D4, que es un anticuerpo monoclonal específico contra Tn, el cual reconoce clusters de Tn di- o trimericos, y se aislaron células Tn+ y Tn- utilizando sorting celular. Al evaluarse *in vivo*, pudimos demostrar que las células tumorales expresando el antígeno Tn conducían a tumores de mayor tamaño que las Tn-, infiltrados con células dendríticas expresando MGL y linfocitos T reguladores productores de IL-10. En este contexto, resulta interesante evaluar si el antígeno Tn sobre células tumorales es capaz de interaccionar con macrófagos y células dendríticas y modular su activación o maduración.

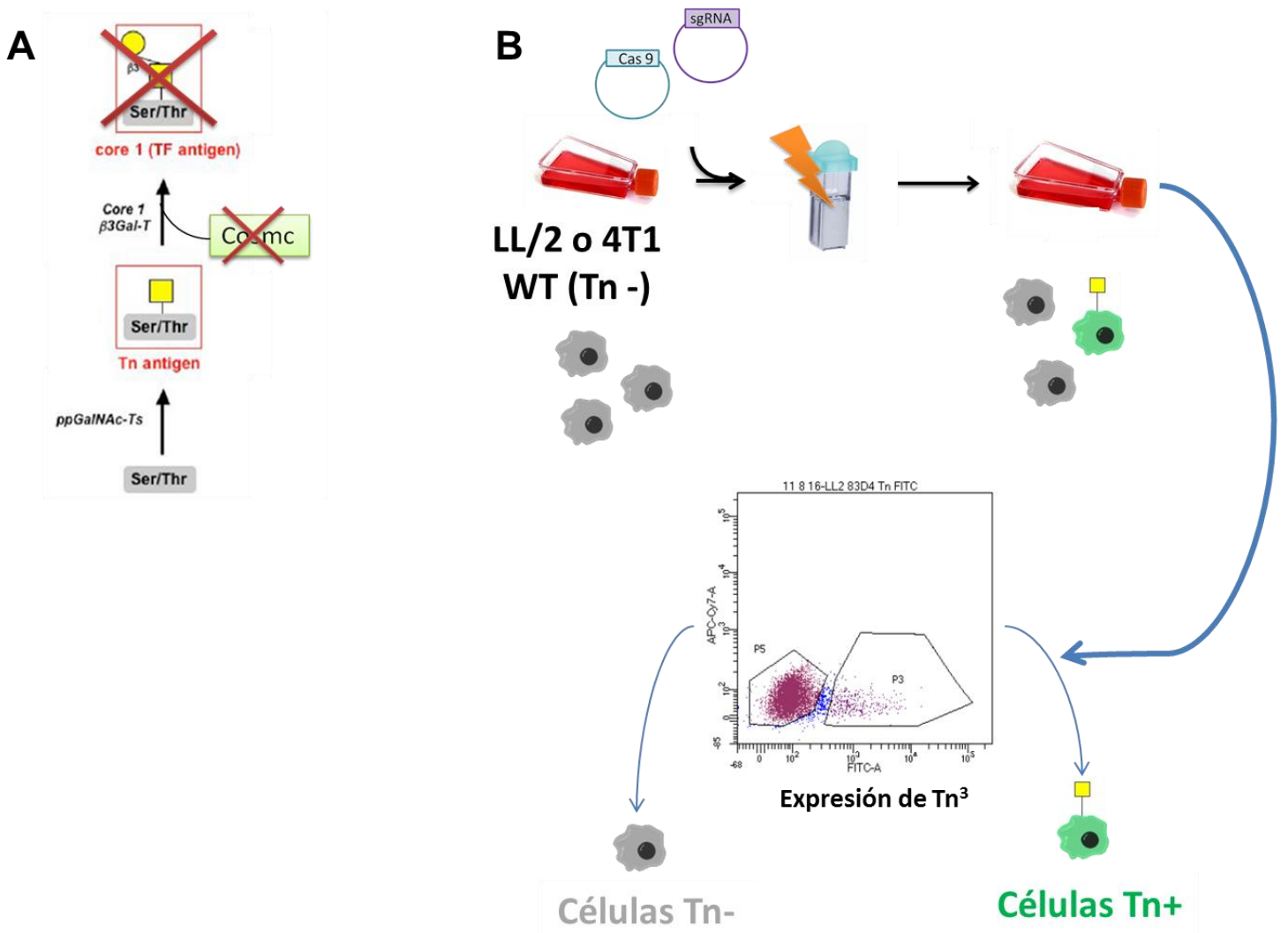


Figura 6: Obtención de las líneas celulares Tn+ y Tn-. Se mutó la chaperona Cosmc esencial para el funcionamiento de la elongación del antígeno Tn (A) utilizando la tecnología Crispr (B). Posteriormente, las células se marcaron con el anticuerpo monoclonal específico de clústers de 3 Tn consecutivos (Tn3) 83D4, y las células fueron clasificadas en un cell sorter por la técnica de “single cell deposition” para seleccionar clones Tn+ y Tn-.

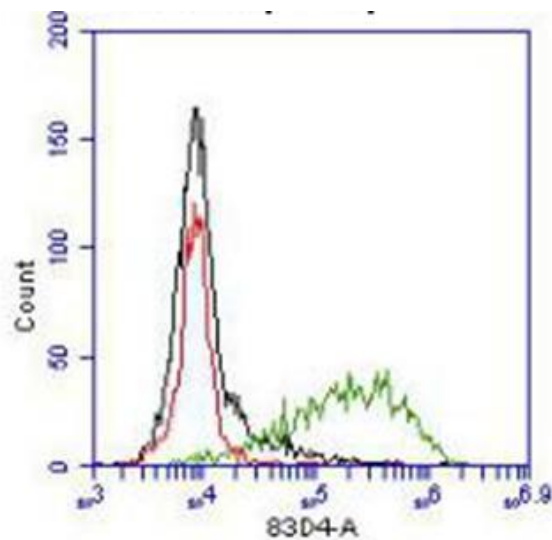


Figura 7: Expresión de Tn en líneas de cáncer de mama 4T1. La expresión del antígeno Tn se analizó por citometría de flujo utilizando el anticuerpo monoclonal 83D4 específico del antígeno Tn, y previamente utilizado para la separación celular de las células. Verde: 4T1 Tn+ C5, rojo: 4T1Tn- C12, negro: 4T1 WT.

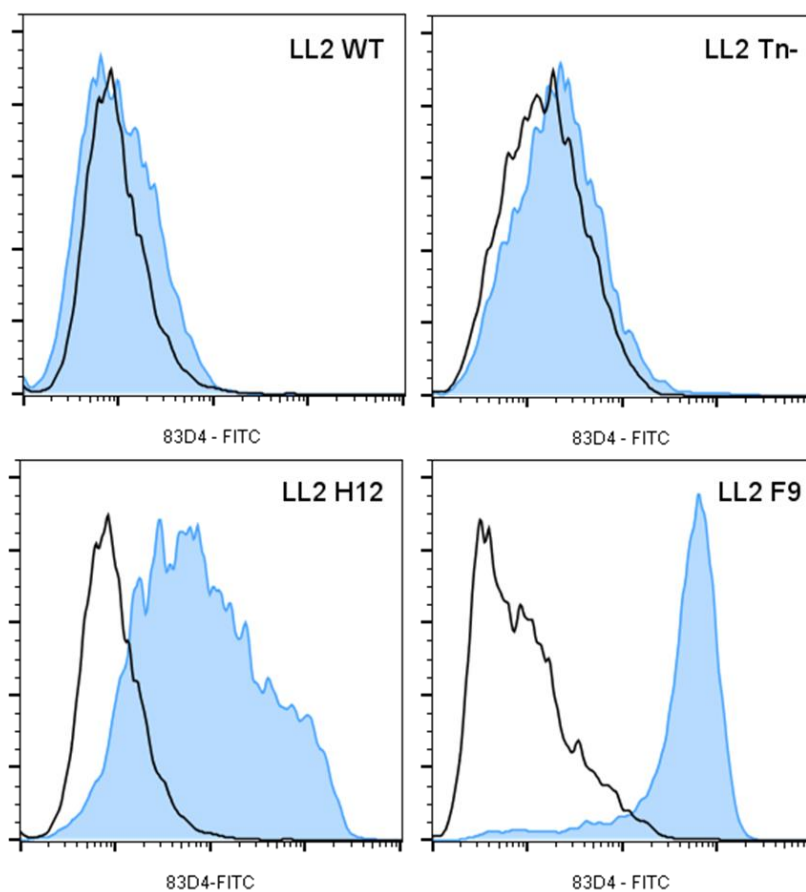


Figura 8: Expresión de Tn en líneas de cáncer de pulmón LL/2. La expresión del antígeno Tn se analizó por citometría de flujo utilizando el anticuerpo monoclonal 83D4 específico del antígeno Tn, y previamente utilizado para la separación celular de las células. El histograma en azul corresponde a la línea celular, mientras el azul al control sin anticuerpo.

Hipótesis de Trabajo

La hipótesis de esta tesina de grado es que el antígeno Tn presente en células tumorales le genera las siguientes ventajas a la célula tumoral: a) media la modulación de la activación de células dendríticas o macrófagos, inhibiendo la expresión de moléculas de co-estimulación y citoquinas pro-inflamatorias y aumentando la producción de citoquinas anti-inflamatorias, y b) le confiere mayor resistencia a la muerte inducida por drogas quimioterapéuticas.

Objetivos

- **Objetivos generales**

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la capacidad de células tumorales Tn- y Tn+ en modular la activación de células dendríticas y macrófagos y analizar su sensibilidad a drogas quimioterapéuticas, utilizando dos modelos tumorales diferentes (mama y pulmón).

- **Objetivos específicos**

1) Determinar la expresión de moléculas co-estimuladoras y MHC de clase II en células dendríticas y macrófagos co-cultivadas con células tumorales Tn- y Tn+ en presencia o en ausencia de un estímulo de maduración/activación.

2) Determinar la producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-12, TNF- α) y anti-inflamatorias (IL-10) en células dendríticas y macrófagos co-cultivadas con células tumorales Tn- y Tn+ en presencia o en ausencia de un estímulo de maduración/activación.

3) Analizar la presencia de glicoproteínas secretadas expresando el antígeno Tn por las líneas tumorales Tn- y Tn+

4) Estudiar la sensibilidad a la muerte inducida por drogas quimioterapéuticas de las líneas tumorales Tn- y Tn+.

Materiales y Métodos

- **Cultivo de células tumorales**

Las células derivadas de la línea celular LL/2, fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (FBS) (10%) antibiótico-antimicótico (1-2%) y β -Mercaptoetanol (50 μ M) (medio completo). Se trabajó con células LL/2 Tn+ (denominadas LL/2 H12 y F9) y Tn- (LL/2 de origen, a la que llamaremos WT por wild type). Al llegar a un 70% de confluencia, las células fueron diluidas 5 veces. Para ello se incubaron con EDTA 2 mM en Buffer fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés, el cual contiene NaCl 0.137 M, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 0.01 M y KH₂PO₄ 1.8 mM en H₂O destilada) agregando 2 mL (para los *flasks* de 25 mL) o 4 mL (para los de 75 mL) durante 10 min a 37 °C. Luego se centrifugaron a 1500 rpm 5 minutos a 4 °C (centrífuga marca: Thermo Scientific, modelo: Sorvall ST 16R) y posteriormente se diluyeron 5 veces en medio de cultivo completo.

Las células derivadas de la línea 4T1 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) (10%) antibiótico-antimicótico (1-2%) (medio completo). Se trabajó con las sublíneas celulares 4T1 Tn+ (denominadas 4T1 C5 por clon 5), Tn- (denominadas 4T1 C12 por clon 12), así como la línea parental 4T1 (a la que llamaremos WT por wild type). Al llegar a un 70% de confluencia, las células fueron diluidas 5 veces. Para ello se incubaron con Tripsina-EDTA 0.1% y 0.04% respectivamente, en PBS, agregando 1.5 mL (para los *flask* de 25 mL) o 3 mL (para los de 75 mL) durante 10 min a 37 °C. Luego se centrifugaron a 1500 rpm 5 minutos a 4 °C utilizando la centrífuga ya especificada, y posteriormente se diluyeron 5 veces en medio de cultivo completo.

- **Cultivo de la línea de macrófagos RAW-264.7**

Las células RAW-264.7 se cultivaron en medio de cultivo DMEM, suero fetal bovino (FBS) (10%) antibiótico-antimicótico (1-2%). Para el cambio de medio, se descartó el mismo y se agregó 2 mL (para los *flasks* de 25 mL) o 4 mL (para los *flasks* de 75 mL) de EDTA 5 mM con FBS 2% en PBS para despegar las células y se incubó 10 min a 37 °C. A continuación, se agregó 5 mL (para los *flasks* de 25 mL) o 7-8 mL de PBS (para los *flasks* de 75 mL) y se resuspendió varias veces. Se centrifugó a 1500 rpm 5

minutos y se descartó el sobrenadante y se diluyeron las células 5 veces en medio completo.

- **Generación de células dendríticas (BMDC)**

Las células dendríticas fueron generadas a partir de los precursores de la médula ósea (BMDC) de tibias y fémures de ratones C57BL/6 (para el modelo de células LL/2) y de ratones BALB/c (para el modelo de células 4T1). Se eliminó todo músculo y piel que rodea dichos huesos con la idea de obtener los huesos lo más limpios posible, y se cortó las extremidades de los mismos. Se los depositó en una placa conteniendo RPMI, suero fetal bovino (FBS) 10%, antibiótico-antimicótico 1-2 %, β -Mercaptoetanol 50 μ M y GM-CSF (20 ng/ml, Peprotech). Luego con una jeringa se cargó medio de dicha placa y se extrajo la médula ósea colocando la jeringa en cada extremo del hueso e inyectando dicho líquido, saliendo así la médula ósea por el extremo opuesto del hueso. Las células dendríticas se contaron y se concentraron a 8×10^6 células/mL en medio completo + GM-CSF (20 ng/ml, Peprotech). Se colocó 1 mL a dicha concentración en una placa estéril, más 7 mL de medio completo con el factor de crecimiento y se incubó a 37 °C. Al tercer día se reforzó cada placa con 4 mL de medio completo más GM-CSF (20 ng/ml, Peprotech). Al séptimo u octavo día, se colectaron las células para su uso, agregando 5 mL de EDTA 1 mM y se esperó durante 5-10 minutos, con el objetivo de recoger solo las células sueltas y las que se hayan pegado débilmente. Luego se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de medio completo, para posteriormente contarlas.

- **Ensayos de co-cultivos de células tumorales con células dendríticas o macrófagos**

Se dispensaron en placas de 96 pocillos de cultivo celular, las BMDC o macrófagos RAW-264.7, plaqueando 150000 a 250000 células por pocillo a una concentración de 3 a 5×10^6 células/mL en ausencia o en presencia de lipopolisacárido (LPS, 1 μ g/mL, Sigma). Posteriormente, se incubó durante 2 horas a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, se agregaron las células tumorales (4T1 de cáncer de mama, o LL/2 de cáncer de pulmón) en la misma proporción que las células dendríticas o macrófagos (1:1) y se incubó toda la noche (overnight, ON) a 37 °C. Los sobrenadantes de cultivo se

utilizaron para la determinación de citoquinas por ELISA, mientras que las células fueron analizadas por citometría de flujo.

- **Determinación de citoquinas por ELISA**

La detección de los niveles de las distintas citoquinas evaluadas fue realizada mediante la técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) Sandwich. Dicho ensayo consistió en sensibilizar placas de 96 pocillos (NUNC, Maxisorp) durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo puro de la citoquina correspondiente en 50 µL de buffer fosfato 10 mM pH 9 para la detección de IL-12 y TNF-α, mientras que para la detección de IL-10 se sensibilizó en buffer fosfato 0.2 M pH 6. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS Tween 0.1%. Luego se bloqueó 1 hora a 37 °C en 100 µL de PTG 1% (Tween 0.1%, Gelatina 1% en PBS). Nuevamente se realizaron los 3 lavados, para luego proceder a la incubación de las muestras, que se realizó durante 1 hora a 37 °C (para IL-12 y TNF-α) u ON a 4 °C (para IL-10) en PTG 0.5% (Tween 0.1%, Gelatina 0,5% en PBS). La curva de calibración se realizó haciendo diluciones seriadas al medio de la citoquina recombinante correspondiente. Para la IL-12 se utilizó como concentración de partida 2,0 ng/µL, para el TNFα se utilizó una concentración de partida de 1,0 ng/µL, mientras que para la IL-10 se la usó a una concentración de 4,0 ng/µL. Proseguimos con los 3 lavados y luego se añadió el anticuerpo secundario biotinilado, durante 1 hora a 37 °C en 50 µL de PTG 0,5%. Transcurrido este paso se realizaron los 3 lavados y se incubó 50 µL de Streptavidina-HRP (BD Bioscience) 1 µg/mL diluida en PBS. Se lavó 6 veces, luego de la incubación de la Streptavidina-HRP para proceder al revelado. El revelado consistió en agregar 200 µL de una solución 0.5 g/L de o-Phenylenediamina dihydroclorido (OPD) en buffer Citrato-Fosfato (0,1 M pH 5) con Peróxido de Hidrógeno 0,12. La placa se incubó en la oscuridad hasta el desarrollo del color. Se paró la reacción con 50 µL de H₂SO₄ 12,5% o HCl 3% por pocillo y se realizó la lectura a 492 nm. Todos los anticuerpos utilizados fueron de BD Biosciences o Biolegend.

Tabla I: Concentraciones utilizadas para cada anticuerpo utilizado en ELISA.

Anticuerpo	Puro (mg/mL)	N° Catálogo	Secundario (mg/mL)	N° Catálogo
α-IL-10	1.33X10 ⁻³	504902 (Biolegend)	1.33X10 ⁻³	554423 (BD Bioscience)
α-IL-12	2.5 X10 ⁻³	551219 (BD Bioscience)	1.25 X10 ⁻³	554476 (BD Bioscience)
α-TNF-α	2.0 X10 ⁻³	1F3F3D4 (BD Bioscience)	5.0 X10 ⁻⁴	13-7326-85 (BD Bioscience)

- **Citometría de Flujo**

Primeramente, se colectaron las células y se dispensaron en placa de fondo cónico. Se lavaron dos veces con buffer FACS (FBS 2% en PBS) por centrifugación a 2000 rpm durante 2 minutos. Luego las células se resuspendieron en 50 µL de la solución correspondiente de anticuerpos en buffer FACS y se incubó la placa durante 30 minutos a 4°C. Pasado el tiempo de incubación, se lavaron dos veces con buffer FACS y se centrifugó de la misma manera entre cada lavado. Se resuspendió con buffer FACS en el volumen final y se pasó cada muestra a tubos de Citometría para el análisis en el equipo BD Accuri™ C6 Plus. Todos los anticuerpos utilizados fueron de BD Bioscience o Biolegend.

Tabla II: Concentración utilizada para cada anticuerpo utilizado en citometría de flujo.

Anticuerpo	Concentración (mg/mL)	N° Catálogo/Clon
α-MHC II (PE)	1.0x10 ⁻⁴	107608 (Biolegend)
α-CD80 (PECy5)	4.0 x10 ⁻⁴	10-10A1 (BD Bioscience)
α-CD86 (APC)	4.0 x10 ⁻⁴	GL1 (BD Bioscience)
α- CD40 (FITC)	2.5 x10 ⁻³	HM 40-3 (BD Bioscience)
α-F480 (APC)	1.0 x10 ⁻³	123116 (BD Biolegend)
α-CD11c (FITC)	1.66 x10 ⁻³	553801 (BD Bioscience)

- **Evaluación de secreción de proteínas al medio extracelular por parte de las células LL/2**

Se plaquearon 1x10⁶ células por cada pocillo en placas de 6 pocillos de la línea celular LL/2 WT o LL/2 H12 y se incubaron por 24 hs a 37°C a 5% CO₂. Luego se procedió a cambiar el medio completo por medio sin FBS, el cual llamamos medio condicionado y se incubaron por 14, 18 y 24 hs a 37°C.

Para el cambio de medio se recogió el medio de las células con cuidado de no despegarlas y se lavó tres veces con PBS. El medio condicionado recogido se guardó a -20 °C. Además, analizamos utilizando Trypan blue las células vivas y las muertas, para poder calcular el % de viabilidad, el cual es el cociente entre las células vivas sobre las muertas.

A los sobrenadantes luego se les realizó una diálisis, de corte 3 KDa, para la cual se utilizó la membrana: MEMBRA-CEL® dialysis tubing, MWCO 7000RC. Luego, se incubó las muestras ON en PBS con agitación constante a 4°C. A posteriori se cuantificó la concentración de proteínas por BCA y se realizó una electroforesis.

- **Cuantificación de Proteínas**

La determinación de la concentración de proteínas fue realizada mediante el método del ácido bicinconínico (BCA). Este método se basa en la formación de un complejo con Cu^{1+} formando un color violeta intenso, en un ambiente alcalino. El color producido en la reacción es estable e incrementa proporcionalmente al aumento de la concentración de proteína. Este método tiene como ventaja su alta sensibilidad y presenta baja variación de proteína a proteína, a diferencia de lo que sucede en el método de Lowry. El protocolo realizado consistió en agregar 10 μL de la muestra con 200 μL de reactivo BCA- CuSO_4 (en proporción 50:1). Luego se incubó a 37°C por 30 minutos, y posteriormente se realizó la lectura de absorbancia a 570 nm (Smith et al. 1985). Se utilizó un estándar de BSA para realizar la curva de calibración, mediante diluciones seriadas al medio a partir de 2 mg/ml.

- **Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS/PAGE)**

Se realizó una electroforesis en un gel de poli-acrilamida (10% gel separador (resolving) y 5% el gel concentrador (stacking) con buffer Tris-HCl, pH 8.8 y pH 6.8, respectivamente). El marcador de peso molecular utilizado fue "NONex® Sharp Unstained" de la marca Invitrogen. Las muestras fueron pre-tratadas de la siguiente manera: se les agregó buffer de muestra (buffer Tris-HCl 0.0625 M pH 6,8, SDS 2%, β -Mercaptoetanol 5%, Glicerol 10% y azul de bromofenol 0.01%) en una proporción 4:1 con respecto a la muestra y se calentó durante 5 minutos en baño de agua a ebullición. Se dejó enfriar y se utilizó para el análisis. Se sembró en el gel, 15 μL del

marcador de peso molecular y 25 μ L de la muestra correspondiente pre-tratada. Luego se corrieron las muestras un voltaje de 80 V durante aproximadamente 45 minutos y luego se aumentó el voltaje a 120 V por aproximadamente 30 minutos más. El gel se tiñó con una solución de 0,1% de Coomassie G250 en 40% H₂O, 10% ácido acético glacial, 50% MeOH. Para desteñirlo, se realizaron varias incubaciones en solución destain (40% H₂O, 10% Ac acético glacial, 50% MeOH) o agua destilada

Tabla III: Reactivos utilizados para la preparación de los geles de Acrilamida

Gel	H₂O (mL)	Acrilamida/Bis 30% (mL)	Buffer del Gel (mL)	SDS 10% (mL)
Concentrador	5.7	1.7	2.5	0.1
Separador	4.1	3.3	2.5	0.1

Inmediatamente después de haber hecho la mezcla anterior, se agregó Tetramethylethylenediamina (TEMED) y persulfato de amonio (APS, 10%) según mostrado en la Tabla IV:

Tabla IV: Volúmenes utilizados de TEMED y APS para cada gel de electroforesis

Gel	TEMED	APS 10%
Separador	10 μ L	100 μ L
Concentrador	20 μ L	100 μ L

- **Dot blot**

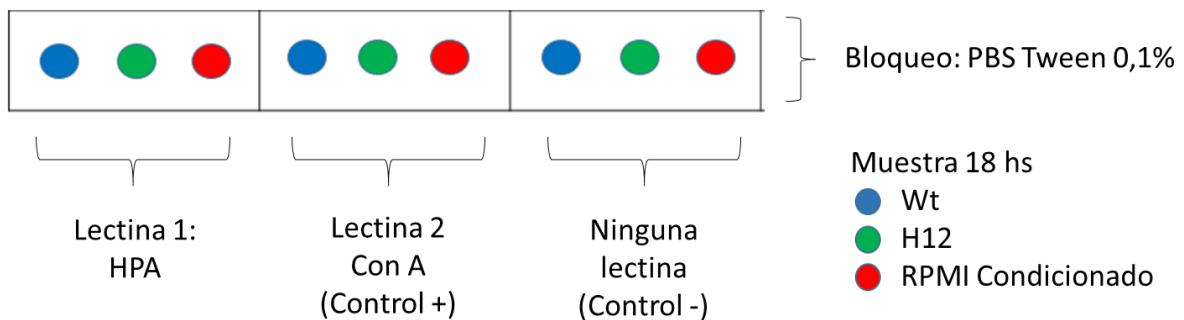


Figura 9: Esquema mostrando el diseño del Dot blot realizado.

Se sembró un spot de medio condicionado de cada muestra durante 30 minutos aproximadamente en una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare, Hybond ECL, RPN203D). Luego se realizaron 3 lavados con PBS Tween 0.1%, cada uno de aproximadamente 5 minutos en un agitador. Una vez realizados los lavados, se procedió al bloqueo con PBS Tween 0.1%, el cual se realizó ON a 4 °C. Al día siguiente se realizaron 3 nuevos lavados como la vez anterior y se incubaron las lectinas HPA (Helix pomatia aglutinin, específica de GalNAc terminal) y ConA (Concavalina A, específicas de manosas y Glucosas en N-glicanos) a temperatura ambiente durante media hora. Las lectinas se utilizaron a 5 µg/ml diluidas en PBS Tween 0.1%. Se lavó la membrana 3 veces por 10 minutos en PBS Tween 0.1%, y se incubó en 200 µL por spot de Streptavidin-Dylight 700 (1 µg/mL) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se realizaron 5 lavados finales de 10 minutos cada uno y se escaneó la membrana en el equipo Li Cor Odyssey 9120.

- **Ensayo de quimiosensibilidad *in vitro***

Se dispensaron 100 µL de células a 2.5 X10⁶ células/mL en placas de 96 pocillos para cultivo celular, partiendo de 250.000 células por triplicado y se realizaron diluciones seriadas al medio de las células hasta plaquear 3900 células por pocillo. Luego se añadió 100 µL de solución con la droga correspondiente diluida en medio completo. Para el modelo LL/2, se utilizaron como drogas, 5-Fluoroacilo (0.5 mg/mL) y Cisplatino (0.05 mg/mL). En el modelo 4T1 se utilizó 5-Fluoroacilo (0.1 mg/mL), Cisplatino (0.5

mg/mL), Paclitaxel (0.43 mg/mL) y Gemcitabina (0.0026 mg/mL). Luego se incubó a 37°C ON. Se retiró 100 µL del volumen de cada pocillo con el fin de tener un volumen final de 100 µL y se agregó 10 µL de la solución Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT, 5 mg/mL) en PBS y luego se incubó durante 4 hs a 37 °C. Después de este período de incubación se agregó 100 µL de HCl 0.01 M- SDS 10% y se incubó ON a 37 °C. Luego se realizó la lectura en el lector de placas a una longitud de onda de 570 nm. Para calcular el porcentaje de viabilidad celular, se consideró el máximo de viabilidad (100%) de las células en ausencia de droga, para cada una de las concentraciones celulares.

- **Análisis estadísticos**

El análisis estadístico de los resultados se realizó por el test Anova de una vía utilizando el software Graphpad Prism6. Un asterisco demuestra una diferencia significativa con un $p < 0.05$, mientras que dos y tres asteriscos corresponden a un $p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente.

Resultados

Con el objetivo de poder evaluar el rol inmunomodulador del antígeno Tn, se trabajó con líneas celulares tumorales Tn+ y Tn- producidas en nuestro laboratorio, derivadas de las líneas 4T1, de cáncer de mama, y LL/2, de cáncer de pulmón. Dentro de la línea 4T1, se trabajó con la línea celular salvaje o wild type (WT), con un clon Tn+ denominado clon 5 (C5) y con un Tn- denominado clon 12 (C12). Con respecto a la línea celular LL/2, se contó con la línea celular parental wild type (WT), con una línea Tn- y células Tn+ (llamadas LL/2 H12 y F9).

En el presente trabajo, nos planteamos evaluar las propiedades inmunomoduladoras del antígeno Tn sobre células dendríticas y macrófagos, utilizando como modelo de las primeras, las células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDC) y de las segundas una línea de macrófagos inmortalizada RAW 264.7.

Para llevar a cabo el primer objetivo, se realizaron co-cultivos de las células tumorales junto con los macrófagos o BMDC. Luego se cuantificó la concentración de citoquinas en el medio extracelular, mediante ELISA y también se evaluó la expresión de marcadores de superficie celular de las células del sistema inmune, por citometría de flujo.

- **Modulación de la activación de células dendríticas por células de cáncer de mama 4T1 Tn+ y Tn-**

En primer lugar, a partir de co-cultivos de células 4T1 y células dendríticas, se evaluó en el sobrenadante celular la producción de tres citoquinas, dos pro-inflamatorias (TNF- α e IL-12) y una anti-inflamatoria (IL-10) en ausencia y presencia de un estímulo de activación (LPS).

Como se muestra en la Figura 10 las BMDC incubadas en ausencia de LPS, produjeron muy bajos niveles de TNF- α , IL-12 e IL-10. Sin embargo, al agregar LPS, se encontraron altos niveles de TNF- α , IL-12 e IL-10 en el medio de cultivo, los cuales disminuyeron significativamente al agregar las tres líneas tumorales de cáncer de mama utilizadas: 4T1 WT, 4T1 C5 (Tn+), 4T1 C12 (Tn-). Estos resultados muestran que todas las líneas tumorales inhiben parcialmente la producción de citoquinas por BMDC estimulada por LPS y que la línea 4T1-C5 que expresa el antígeno Tn, no induce un efecto diferente a la Tn- o a la parental.

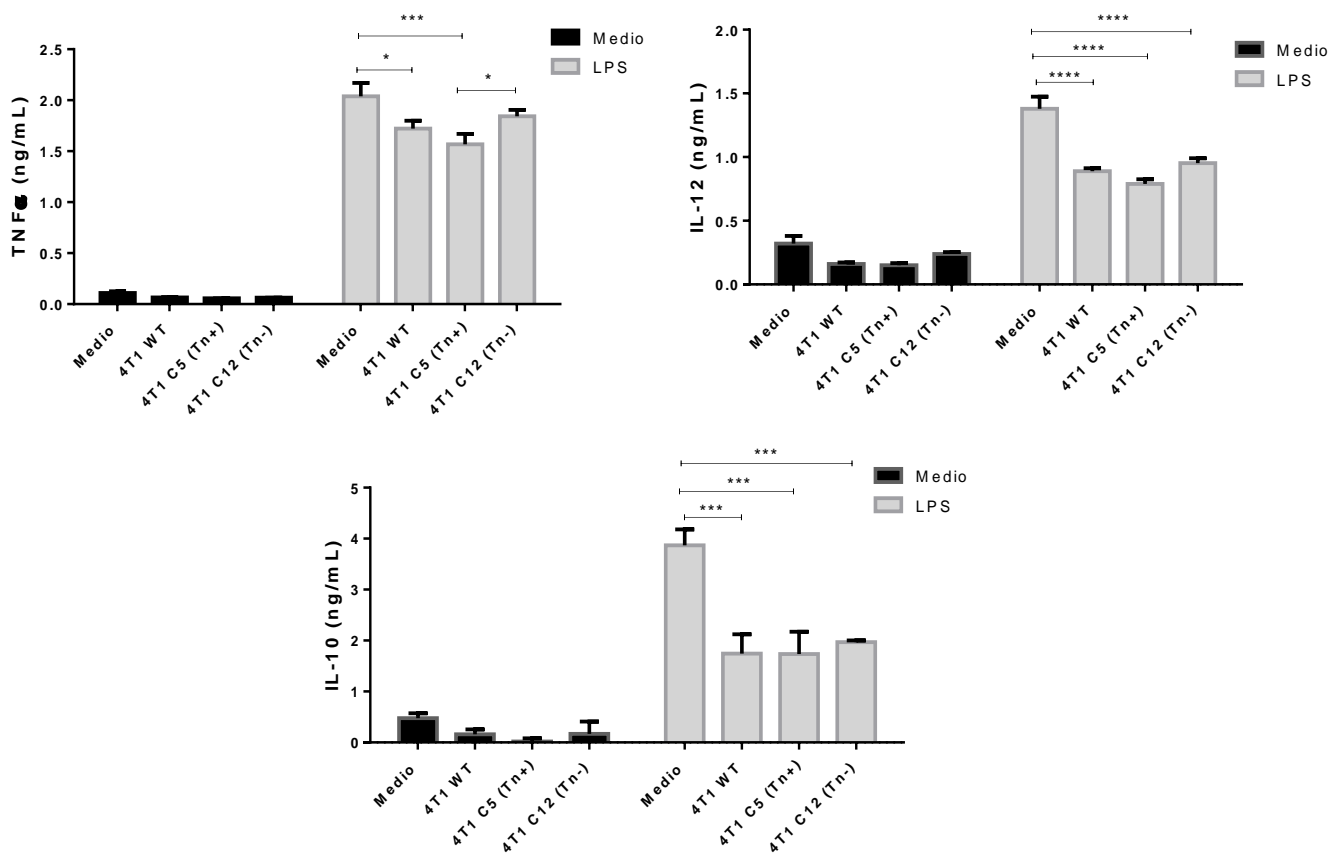


Figura 10: Modulación de la producción de citoquinas por BMDC por parte de células tumorales de cáncer de mama. Se muestra los niveles de las citoquinas TNF- α , IL-12 e IL-10, cuantificadas por ELISA, presentes en el medio de cultivo de BMDC y células tumorales 4T1, en presencia o ausencia de LPS.

Para confirmar si las células dendríticas eran las productoras de citoquinas y no las células tumorales, se cultivó las células tumorales en ausencia de las células dendríticas en las mismas condiciones. Como era esperado, las células tumorales no produjeron niveles significativos de las citoquinas analizadas (Figura 11), indicando que las citoquinas producidas provienen de las BMDC.

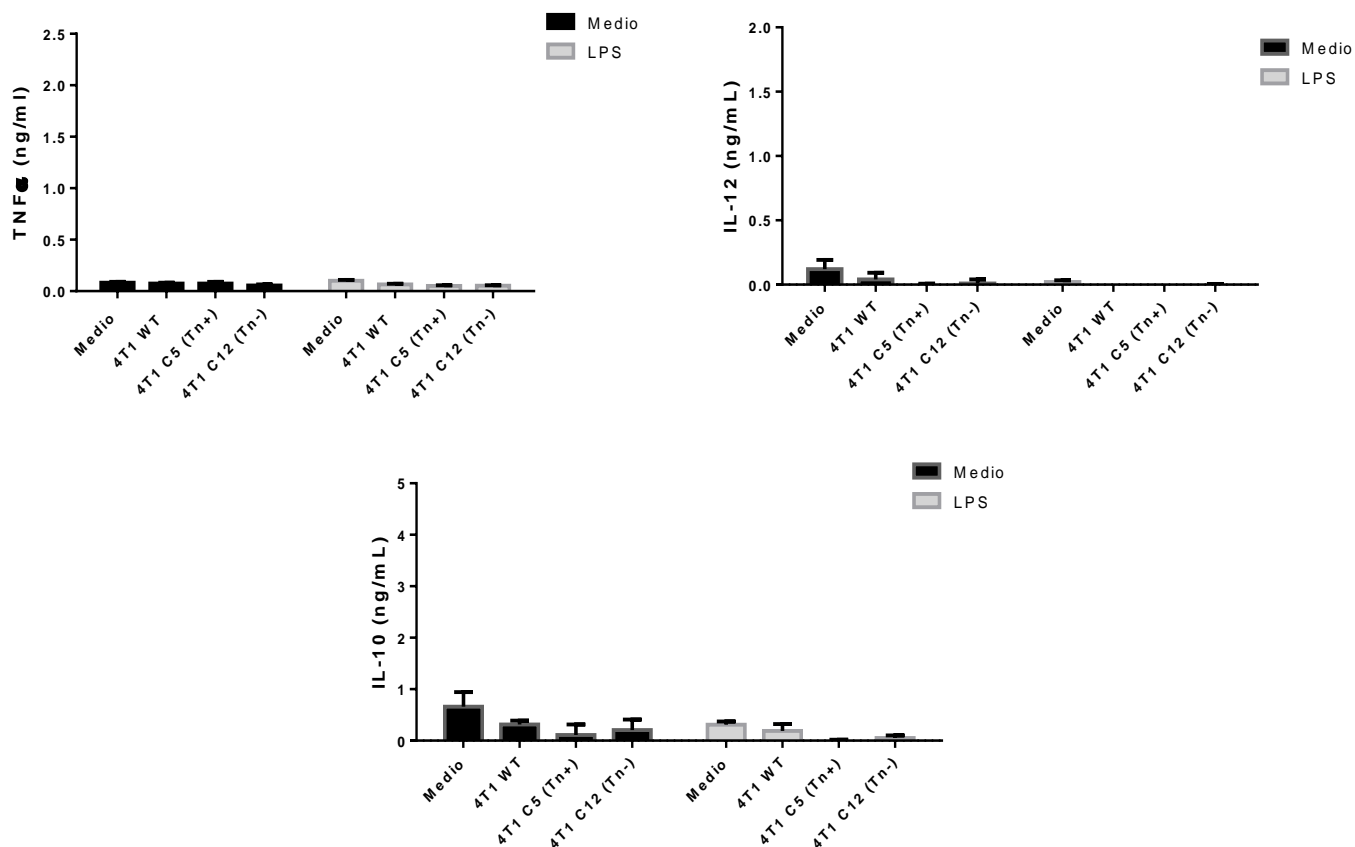


Figura 11: Producción de citoquinas por células tumorales de cáncer de mama. Se muestra los niveles de las citoquinas TNF- α , IL-12 e IL-10, cuantificadas por ELISA, presentes en el medio de cultivo de células tumorales 4T1, en presencia o ausencia de LPS.

Para poder evaluar con mayor profundidad el fenotipo que adopta la célula dendrítica al ser cultivada con las distintas células tumorales, se realizaron análisis de citometría de flujo en las BMDC posterior a su incubación con las células tumorales. Se seleccionaron las células CD11c⁺ y se analizó la expresión de marcadores de activación MHC de clase II, CD80, y CD86.

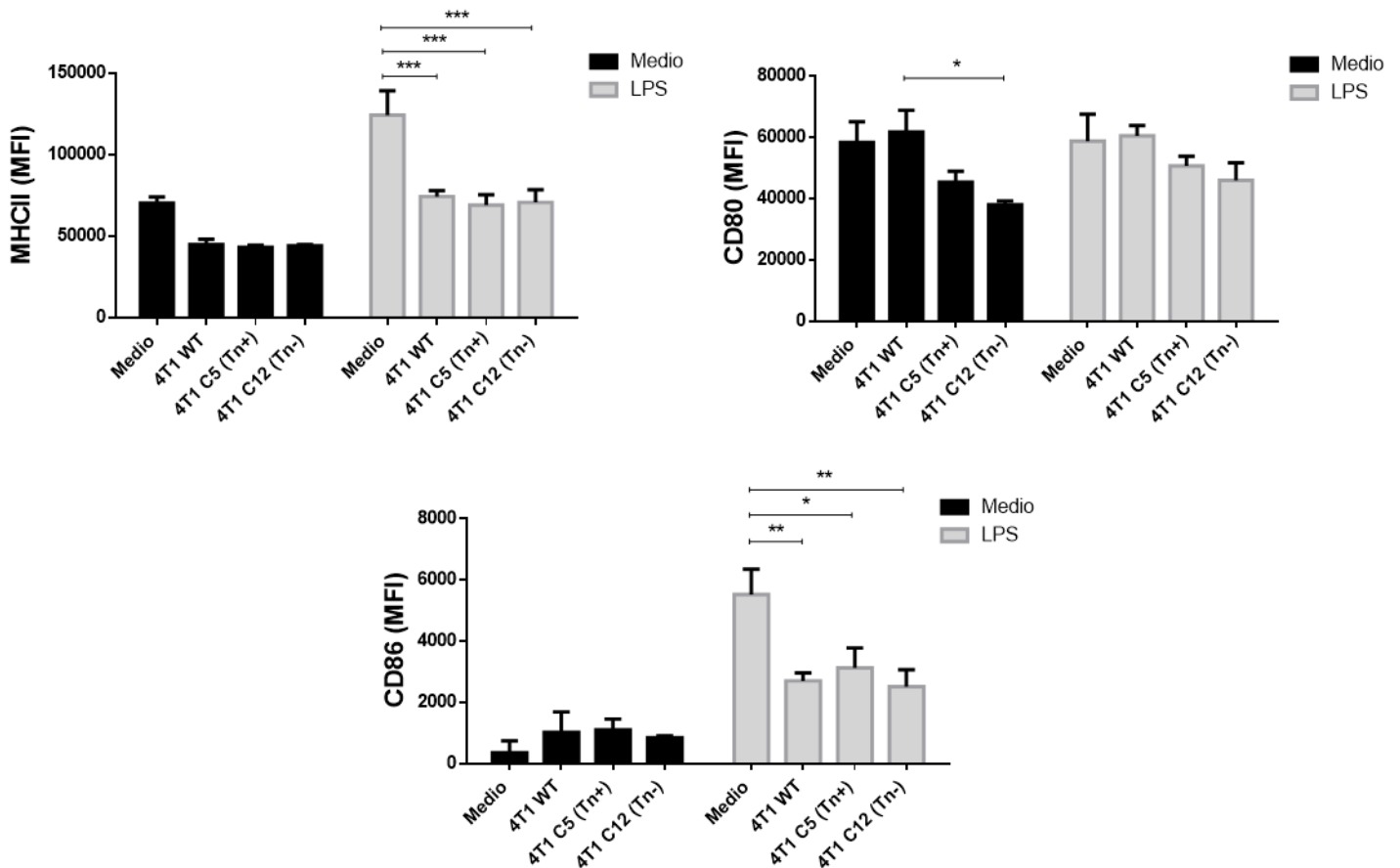


Figura 12: Modulación de la expresión de MHCII y moléculas co-estimuladoras por BMDC por parte de células tumorales de cáncer de mama. Se muestra la expresión de los marcadores de superficie celular MHC de clase II, CD80 y CD86, por células CD11c positivas, cuantificada por citometría de flujo, en presencia o ausencia de LPS.

Como se muestra en la Figura 12, las BMDC solo presentaron niveles apreciables de intensidad de fluorescencia media para los marcadores MHC de clase II y CD80 en ausencia de estímulo activador. Por otro lado, en presencia de LPS, las BMDC aumentaron la expresión de MHC de clase II y de CD86, la cual disminuyó significativamente al incubarlas con las células tumorales. Para el caso de CD80, no se vio diferencias entre la condición medio y LPS. A modo de conclusión general, nuevamente, la presencia o ausencia de Tn en las distintas líneas celulares trabajadas, no fue un diferencial en la modulación de la célula dendrítica. Cabe destacar que la sublínea 4Tn-Tn- disminuyó los niveles de CD80 en ausencia de LPS con respecto a la parental.

- **Modulación de la activación de macrófagos por células de cáncer de mama 4T1 Tn+ y Tn-**

En este modelo, se co-cultivaron macrófagos RAW-264.7 con las células de cáncer de mama 4T1. Se evaluó la presencia de citoquinas en el sobrenadante de cultivo, no detectándose niveles de IL-12 ni de TNF- α , pero sí de IL-10. En ausencia de estímulo activador, los macrófagos sólo produjeron IL-10 en ausencia de las células tumorales. Por otro lado, en presencia de LPS, el nivel de citoquina detectado fue mayor. Sin embargo, éste disminuyó significativamente cuando los macrófagos fueron co-cultivados en presencia de cualquiera de las tres líneas tumorales trabajadas, no habiendo una diferencia entre ellas. Por tanto, estos resultados muestran que la línea 4T1 C5 (Tn+) tampoco induce un efecto diferente a la Tn- o a la parental sobre las citoquinas secretadas por macrófagos, activados con LPS.

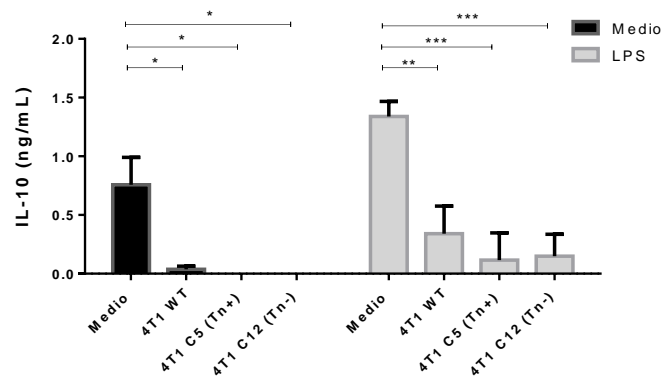


Figura 13: Modulación de la producción de citoquinas por macrófagos por parte de células tumorales de cáncer de mama. Se muestra los niveles de la citoquina IL-10, cuantificados por ELISA, presentes en el medio de cultivo de macrófagos RAW-264.7 y células tumorales 4T1, en presencia o ausencia de LPS.

En cuanto al análisis de expresión de marcadores de activación en los macrófagos, se seleccionaron las células positivas para el marcador F4/80, y se analizaron los cambios en la expresión de MHC de clase II, CD80 y CD40 por citometría de flujo.

En este caso, se encontraron diferencias significativas entre la línea Tn+ y la Tn- o la parental. Estas diferencias se pueden apreciar para la expresión de MHC de clase II y

CD40, tanto en medio como en LPS, donde en presencia de medio, el nivel de intensidad de fluorescencia media de MHC de clase de clase II no decae cuando se incuban los macrófagos junto con las células 4T1 C5 (Tn+), sin embargo, la expresión de MHC de clase II disminuye significativamente cuando se cultivan los macrófagos con las células 4T1 C12 y WT. En presencia de LPS, se da una caída significativa de la intensidad de fluorescencia media cuando se co-cultivan los macrófagos con cualquiera de las 3 variantes tumorales. Sin embargo, la caída es significativamente menor para el caso de la variante Tn+. Para el caso de CD40, en presencia de medio, los niveles de fluorescencia fueron iguales entre los distintos cultivos, salvo para el caso en que los macrófagos fueron co-cultivados con las células 4T1 C5, donde se observó un aumento significativo. Por otro lado, en presencia de LPS, observamos el mismo comportamiento que se dio para MHC de clase II en presencia de LPS. Por último, no se observaron cambios en la expresión de CD80 por los macrófagos al incubarlos con las células tumorales, tanto en ausencia como en presencia de LPS.

A modo de resumen de este análisis, todas las líneas tumorales evaluadas inhibieron el aumento de la expresión de MHCII y CD40 inducido por LPS. Sin embargo, esta inhibición fue levemente menor en presencia de Tn en las células tumorales.

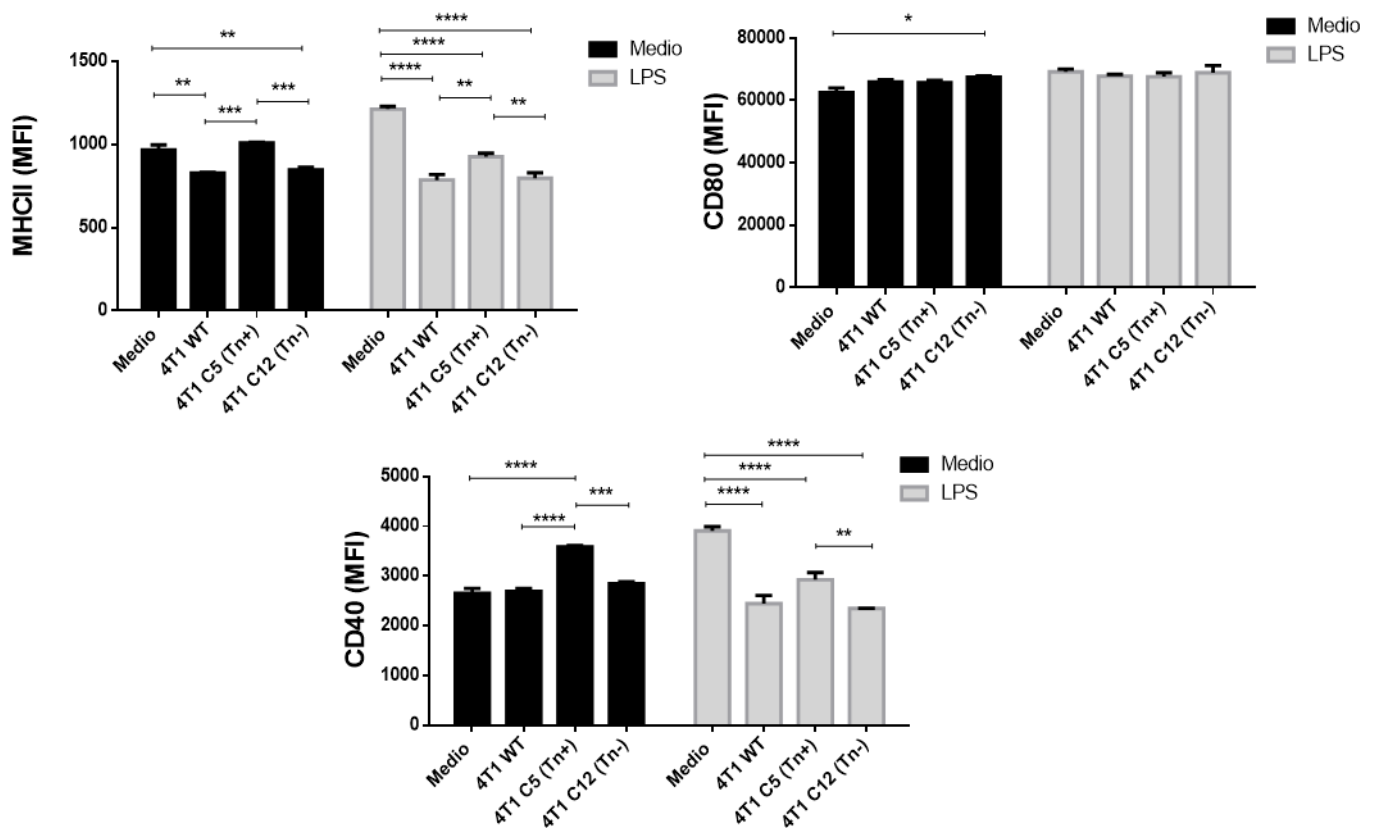


Figura 14: Modulación de la expresión de MHCII y moléculas co-estimuladoras de citoquinas por macrófagos por parte de células tumorales de cáncer de mama. Se muestra la expresión de los marcadores de superficie celular MHC de clase II, CD80 y CD40 por células F4/80 positivas, cuantificada por citometría de flujo, en presencia o ausencia de LPS.

- **Modulación de la activación de BMDCs por células de cáncer de pulmón LL/2 Tn+ y Tn-**

Se realizaron co-cultivos de BMDC purificadas de ratones C57BL6 con las células tumorales LL2 Tn+ y Tn- y se evaluaron los niveles de IL-12 y de TNF- α . En la Figura 15, podemos ver, que en presencia de LPS, los niveles de ambas citoquinas fueron mayores que en la condición medio, como se observó en los modelos anteriores. Sin embargo, a diferencia de los modelos anteriores, cuando se co-cultivaron las BMDC en presencia de la variante F9 (Tn+), tanto para el caso de IL-12 como de TNF- α , se observó un aumento en los niveles de citoquinas frente a la variante Tn-, tanto en presencia como en ausencia de LPS. Otro hecho destacable, es que cuando se co-cultivaron a las BMDC junto con las LL/2 F9, el nivel de IL-12 fue mayor que el

detectado cuando las BMDC se encuentran solas. Lo mismo sucedió para TNF- α , pero solo en la condición medio.

Por último, el ensayo de incubación de las células tumorales únicamente en presencia de estímulo, demostró que la producción de citoquinas proviene de las células dendríticas (Figura 16). Estos resultados sugieren que la línea LL/2 Tn+ induce la secreción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de las células dendríticas, mientras que las LL/2 Tn-, la disminuye.

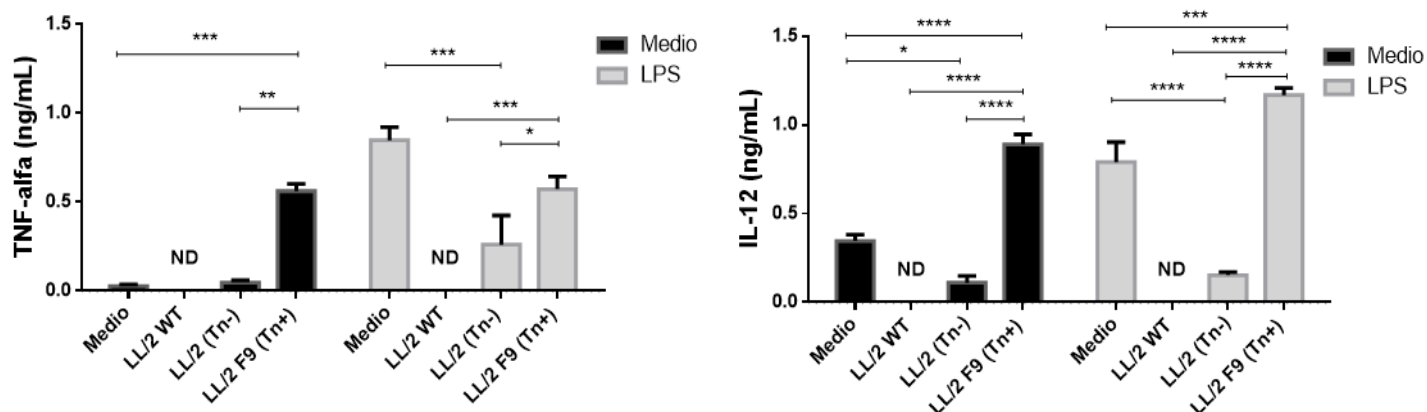


Figura 15: Modulación de la producción de citoquinas por BMDC por parte de células tumorales de cáncer de pulmón. Se muestra los niveles de las citoquinas TNF- α e IL-12, cuantificadas por ELISA, presentes en el medio de cultivo de BMDCs y células tumorales LL/2, en presencia o ausencia de LPS. ND (no determinado).

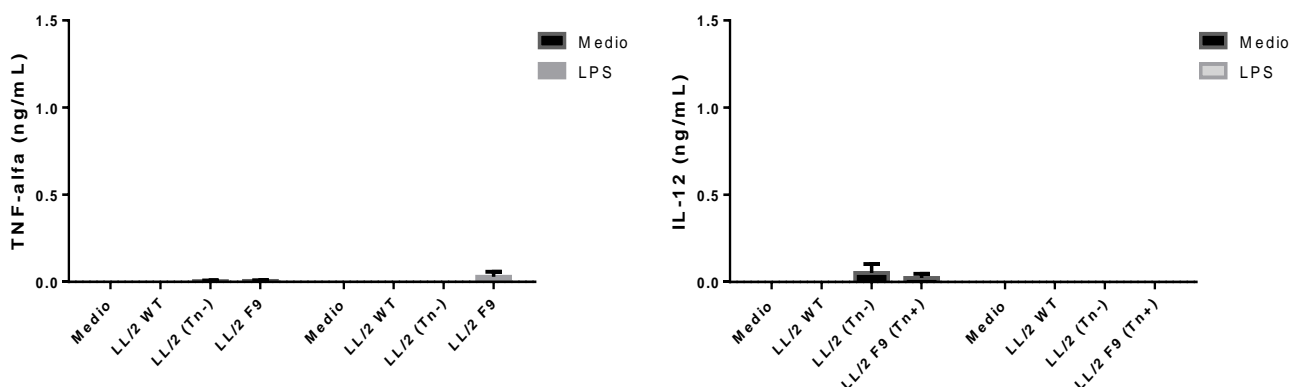


Figura 16: Producción de citoquinas por células tumorales de cáncer de pulmón. Se muestra los niveles de las citoquinas TNF- α e IL-12, cuantificadas por ELISA, presentes en el medio de cultivo de células tumorales LL/2, en presencia o ausencia de LPS.

- **Evaluación de la secreción de glicoproteínas por parte de las células LL/2**

Como siguiente objetivo, se planteó evaluar si las células tumorales secretan al medio extracelular moléculas que pudieran inmunomodular a las células dendríticas de forma parácrina. Para evaluar la presencia de dichas glicoproteínas secretadas por las células tumorales al medio extracelular, en un primer momento, se realizó una puesta a punto de la incubación de las células en medio sin FBS, para determinar el tiempo al cual se obtenía una mayor concentración proteica, sin afectar en gran medida la viabilidad celular. Para esto, se incubaron las células en medio en ausencia de FBS y se recogió medio condicionado a distintos tiempos para su posterior estudio. A medida que los medios iban siendo recogidos, las células remanentes fueron despegadas y contadas para poder calcular el % de viabilidad, ya que las células tumorales fueron incubadas en ausencia de FBS, como se especifica en materiales y métodos. Como se observa en la Figura 17, la viabilidad promedio de las células cultivadas en estas condiciones fue de 50%, siendo la de LL/2-H12 (Tn+) levemente menor a la parental.

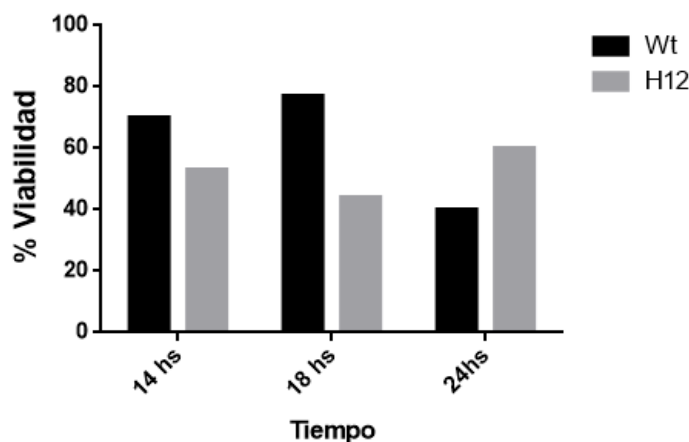


Figura 17: Viabilidad de las células de cáncer de pulmón cultivadas en ausencia de FBS. Se muestra el % de viabilidad celular a distintos tiempos, de las células LL/2, tanto Tn+ (H12) como Tn- (WT).

Luego de este ensayo las muestras fueron dializadas, con el fin de remover el medio de cultivo, el rojo de fenol y aminoácidos libres y así evitar interferencia con el ensayo de cuantificación de proteína. Los mismos fueron determinados por el método del ácido bicinonínico (BCA), no obteniéndose niveles detectables de proteína luego de la diálisis.

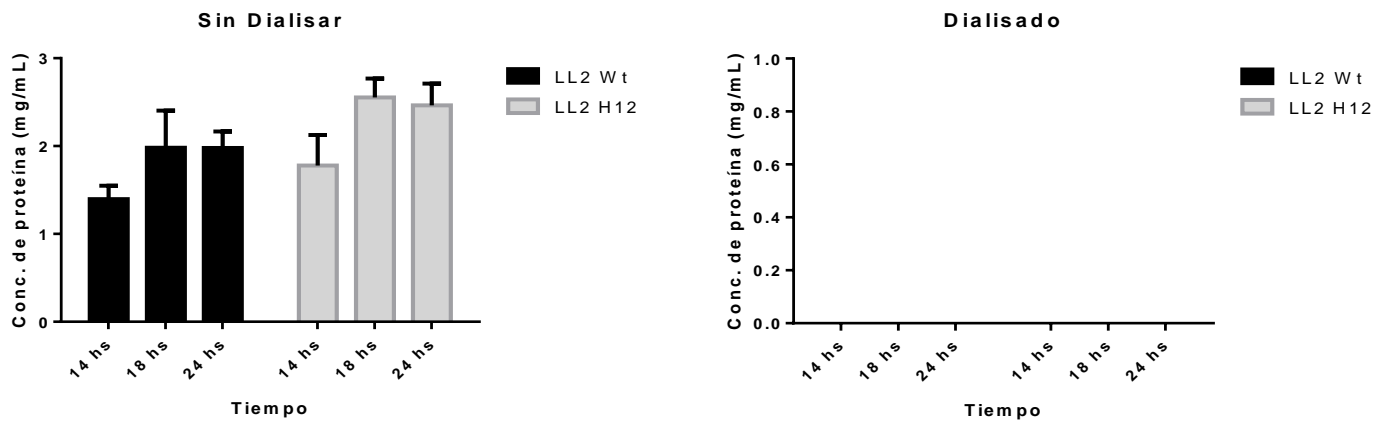


Figura 18: Dosificación de proteína en el medio condicionado obtenido. Se muestran las distintas concentraciones de proteína, calculados mediante el método del ácido bicinconínico (BCA), de los medios condicionados *pre* y *post* diálisis.

A partir de los resultados anteriores y para determinar la presencia de proteínas en el medio condicionado, se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Se evaluó solamente la muestra de medio condicionado correspondiente a las 18 horas, dado que fue la que presentó relativamente mayor viabilidad celular, tanto para la línea LL/2 WT como LL/2 H12.

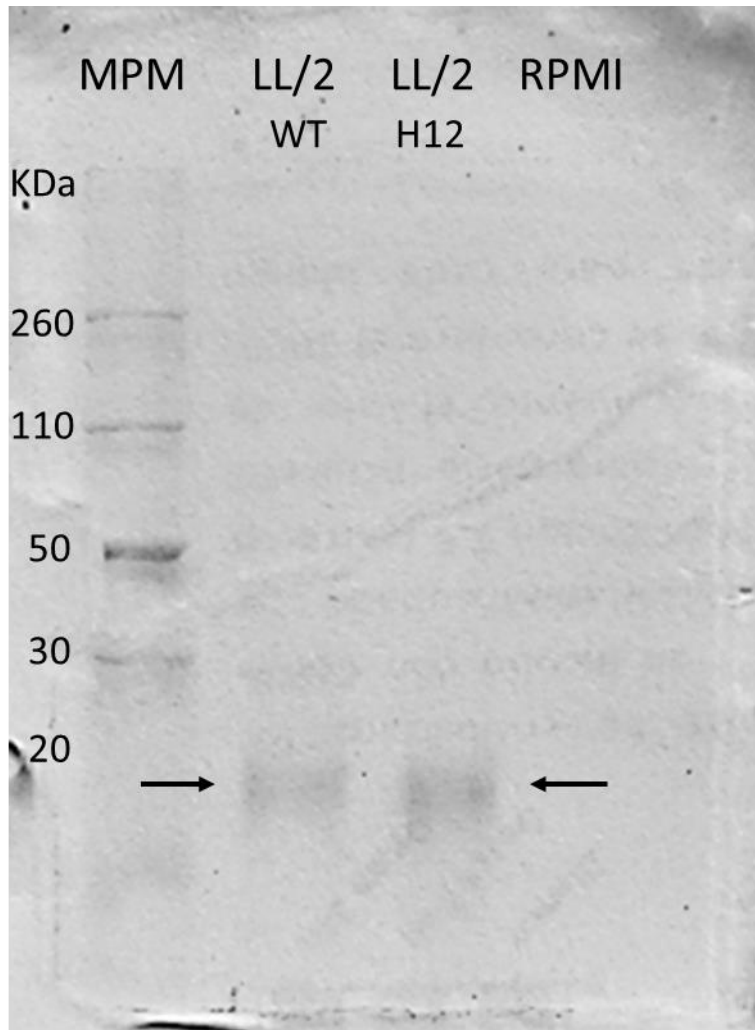


Figura 19: Identificación de componentes proteicos en el medio condicionado. Se muestra la electroforesis realizada en condiciones desnaturizantes, donde se corrieron los medios condicionados de las líneas LL/2 (WT y H12) correspondientes a las 18 hs, previo a dializar.

Como podemos apreciar en la Figura 19, observamos componentes mayoritarios entre 15 y 20 KDa para ambas líneas celulares analizadas. Estos resultados indican que es posible recuperar componentes proteicos en el medio condicionado del cultivo celular de LL/2, aunque en muy bajas concentraciones.

- **Determinación de motivos carbohidratos en el medio condicionado**

Para evaluar si las células tumorales secretan al medio extracelular proteínas Tn+, y así en parte poder explicar una eventual inmunomodulación en las células dendríticas por parte de dichas proteínas, se realizó un ensayo de Dot Blot utilizando dos lectinas: HPA (específica de GalNAc) y ConA (reconoce Manosa y Glucosa en N-Glicanos). Para ello trabajamos con la muestra de medio condicionado recogido a las 18 horas, y con las lectinas HPA y Con A. De este modo, la unión de la HPA indica la presencia de Tn en proteínas presentes en el medio condicionado. Por otro lado, utilizamos la ConA como control positivo, ya que estudios anteriores de nuestro grupo de investigación muestran que esta lectina reconoce ambas líneas tumorales (la parental y la H12). Por último, en el carril "RPMI" se muestra el medio de cultivo (sin FBS) en ausencia de células tumorales, que sirvió como control negativo.

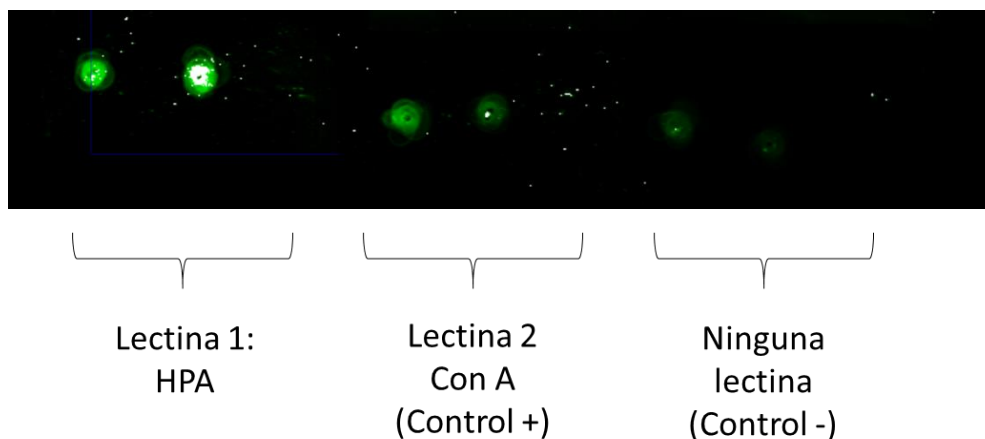


Figura 20: Reconocimiento del medio condicionado producido de células tumorales por parte de lectinas. Se muestra el resultado obtenido del dot blot para analizar reconocimiento por lectinas, utilizando el equipo Oddisey 9120.

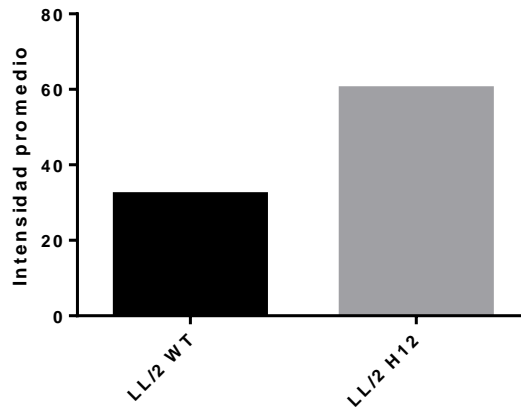


Figura 21: Cuantificación de la reactividad de la lectina HPA por las moléculas secretadas por las líneas tumorales LL/2. La cuantificación se realizó a través de la medición de la intensidad promedio de fluorescencia utilizando el software “ImageJ”, a través de la delimitación de un área idéntica para los dos spots seguido del cálculo de la intensidad promedio dentro de la misma.

Como se muestra en la Figura 20 y 21 se observó un incremento de la reactividad de HPA en el medio condicionado proveniente de las células Tn+.

- **Evaluación de la quimiosensibilidad a drogas quimioterapéuticas**

Para poder evaluar si la presencia del antígeno Tn influye en la quimioresistencia/quimiosensibilidad de las células tumorales, se diseñó un ensayo donde se dispuso distinto número de células tumorales en presencia de una única concentración de droga y se midió el % de viabilidad celular mediante el ensayo de MTT, como se detalla en materiales y métodos. Este ensayo se realizó para las células LL2 Wt y LL2 H12. Para el modelo 4T1, se usaron las variantes Wt, C5 y C12.

En la Figura 22, se observa cómo se afecta la viabilidad celular al incubar las líneas de cáncer de pulmón LL/2 (WT (Tn-) y H12 (Tn+)) con 5-Fluorouracilo y Cisplatino.

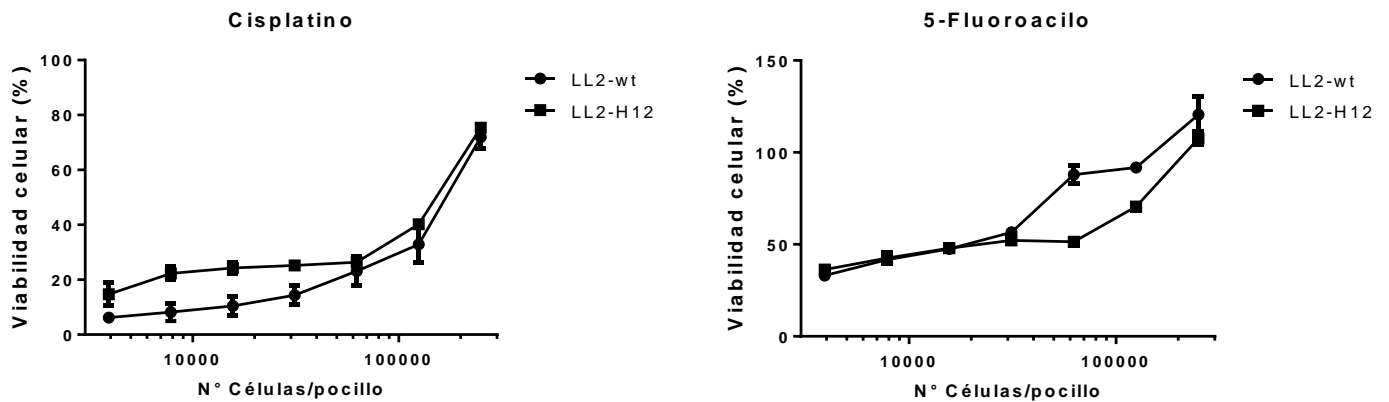


Figura 22: Sensibilidad a la muerte inducida por drogas 5-Fluorouracilo (0.5 mg/mL) y Cisplatin (0.05 mg/mL). Se plaquearon de 0 a 250000 células en presencia de la droga y se realizó el ensayo de viabilidad celular utilizando el reactivo MTT.

En presencia de la droga 5-Fluorouracilo, podemos ver una diferencia en la viabilidad celular, entre 30000 y 125000 células/pocillo. En este rango las células Tn+ son las que presentan menor viabilidad celular frente a las WT. Por otro lado, en presencia de Cisplatin encontramos una diferencia en la respuesta frente a la droga, a partir de 0 a 30000 células/pocillo, en donde la línea LL/2 H12 (Tn+) presentó mayor viabilidad. Estos resultados demuestran un comportamiento diferente de las líneas tumorales LL/2 Tn+ y Tn- frente a dos drogas diferentes, en donde la Tn+ parece ser más sensible que la línea parental, a la muerte inducida por 5-Fluorouracilo, mientras que observamos el efecto contrario frente al Cisplatin.

Por otro lado, se analizó la sensibilidad a la muerte inducida por drogas quimioterápicas en el modelo de cáncer de mama 4T1. En este caso, se trabajó con dos drogas más, además de las utilizadas para el modelo LL/2, estas fueron, el Paclitaxel y Gemcitabina. La utilización de estas drogas fue de gran interés, ya que son las drogas que se utilizan hoy en día para el tratamiento del cáncer de mama (Chemotherapy for Breast Cancer Treatment, 2019.; Chemotherapy for Breast Cancer | American Cancer Society, 2019.)

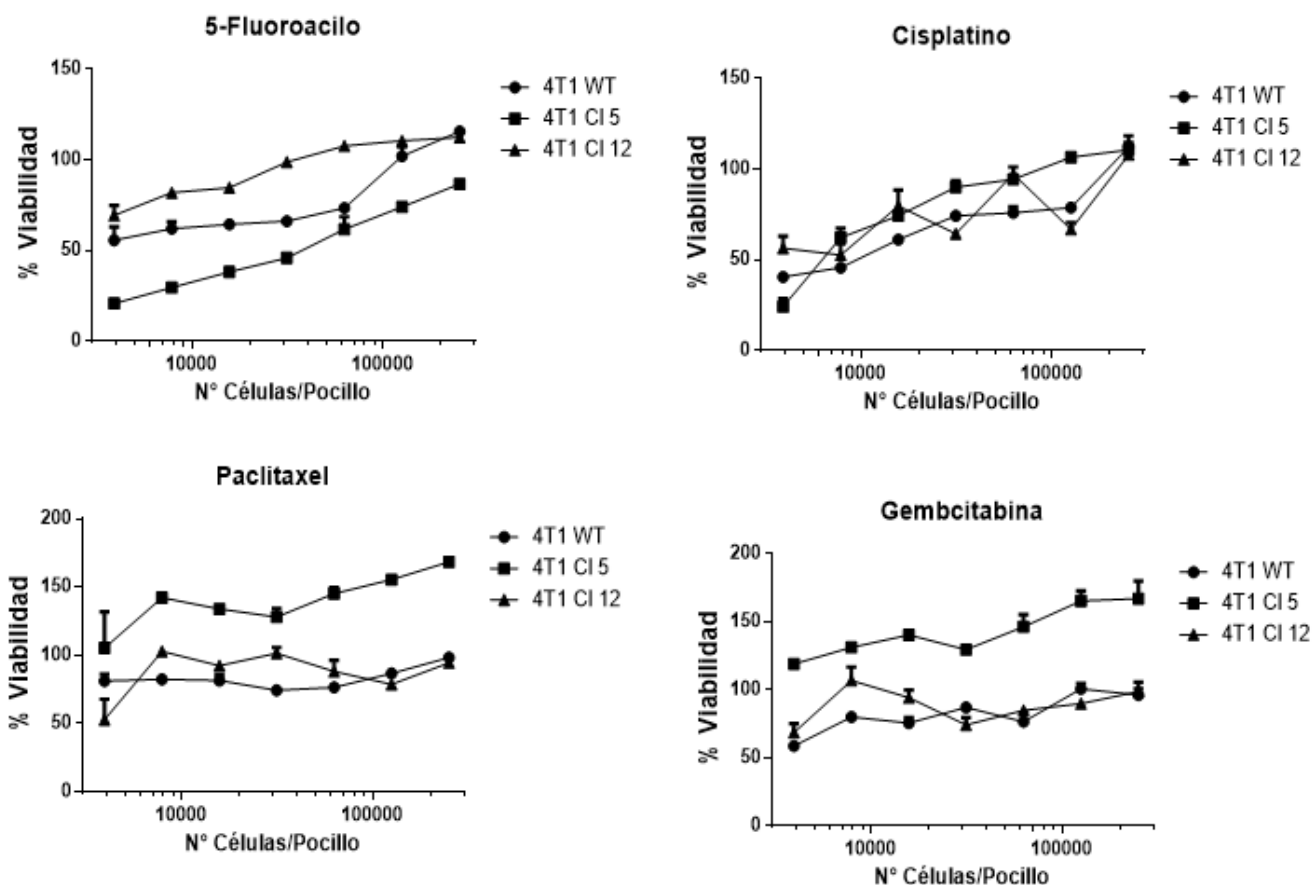


Figura 23: Sensibilidad a la muerte inducida por drogas 5-Fluorouracilo (0.1 mg/mL), Cisplatino (0.5 mg/mL), Paclitaxel (0.43 mg/mL) y Gemcitabina (0.0026 mg/mL). Se plaquearon de 0 a 250000 células en presencia de la droga y se realizó el ensayo de viabilidad celular utilizando el reactivo MTT.

Como se observa en la Figura 23, en este caso tuvimos resultados variados. En presencia de 5-Fluorouracilo, la línea celular Tn+, 4T1 C5 (Tn+), presentó menor viabilidad celular, mientras que la Tn-, 4T1 C12, mostró el mayor índice de viabilidad. Por último, la línea 4T1 parental (WT) presentó un comportamiento intermedio.

Por otro lado, el Cisplatino no indujo diferencias significativas en la viabilidad de las tres líneas de cáncer de mama analizadas. Sin embargo, encontramos un resultado diferente cuando incubamos las tres líneas de cáncer de mama con Paclitaxel y Gemcitabina (Figura 23, panel inferior). En ambos casos se observó una leve disminución de la viabilidad de las líneas celulares Tn- (4T1 WT y 4T1 C12). En cambio, la línea Tn+ (4T1 C5), mostró mayor viabilidad (150%) que las células

incubadas sin droga (100%) lo que indica una proliferación ante la incubación con Paclitaxel y Gemcitabina.

Discusión y perspectivas

En este trabajo, se exploraron las propiedades inmunomoduladoras del antígeno Tn presente en células tumorales de pulmón y mama, sobre las células dendríticas (utilizando BMDC como modelo) y los macrófagos (RAW 264.7). Para ello, se trabajó con un modelo de cáncer de mama (4T1) y de pulmón (LL/2) de los cuales se dispone de sublíneas Tn+ y Tn-. En términos generales, en el caso del modelo de cáncer de mama tanto las sublíneas Tn+ como las Tn- inhibieron parcialmente la activación de las células dendríticas y de los macrófagos, por lo que la presencia de Tn en las células tumorales no se asoció con un efecto diferente al de la línea parental o la Tn- en la activación de las células presentadoras de antígeno evaluadas. Por otro lado, en el caso del modelo de cáncer de pulmón, la línea Tn+ se comportó diferente, induciendo un aumento de las citoquinas pro-inflamatorias evaluadas en presencia del LPS, mientras que la sublínea Tn- inhibió la producción de las mismas. Sin embargo, en ninguno de los modelos evaluados no detectamos inhibición de la activación de las células dendríticas o macrófagos asociado a la presencia del antígeno T como habíamos postulado en nuestra hipótesis.

Para poder investigar si los posibles efectos del antígeno Tn sobre las células tumorales se atribuyen a una posible interacción con el receptor de lectina MGL (cuyo ortólogo es MGL2 en ratón), resulta necesario comprobar su expresión tanto en las células dendríticas como en los macrófagos. En ese sentido, nuestro grupo de trabajo, realizó estudios para comprobar la presencia de MGL2 en las BMDC previo a este trabajo (Figura 24). Por otro lado, en relación a la expresión de MGL2 en la línea de macrófagos RAW 264.7, ésta ya ha sido estudiada y reportada (Upham et al. 2010).

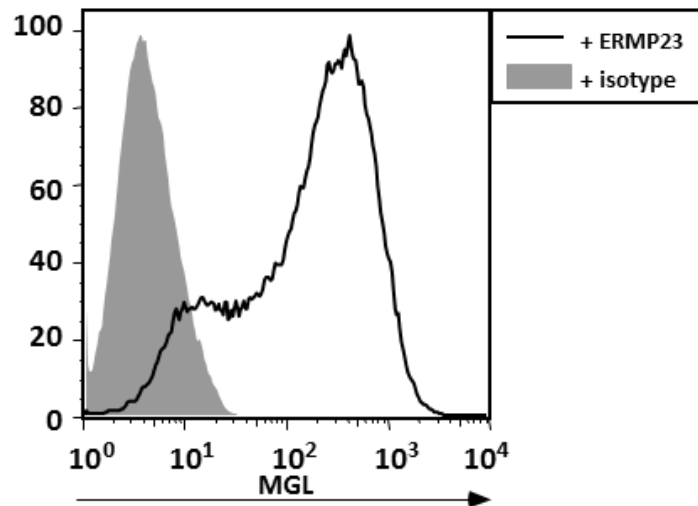


Figura 24: Expresión de MGL2 en BMDCs. La expresión de MGL2 se realizó utilizando un anticuerpo específico conjugado a un fluorocromo y se analizó por citometría de flujo.

Por otro lado, resulta importante confirmar en el modelo de cáncer de pulmón LL/2 que los resultados obtenidos (aumento de IL-12 y $TNF\alpha$ en presencia de LPS) son mediados por el antígeno Tn y el receptor MGL2. Para ello podríamos realizar el mismo tipo de ensayo de activación de las BMDCs en presencia de un anticuerpo específico bloqueante de MGL2 o del antígeno Tn.

En este marco, es interesante discutir algunos resultados publicados sobre la función de MGL en la activación de las células dendríticas. La estimulación de este receptor, ya sea utilizando glicopéptidos-Tn, moléculas parasitarias que presentan el antígeno Tn o anticuerpos estimuladores específicos, reportan que MGL (o MGL2 en los modelos murinos) media un aumento de la producción de IL-10 y $TNF\alpha$ en presencia de ligandos de TLR, mientras que en su ausencia no provoca un efecto detectable (van Vliet et al. 2013; Satoskar et al. 2017) por un mecanismo que involucraría el aumento de la estabilidad del ARN mensajero de IL-10 y $TNF\alpha$ (van Vliet et al. 2013). Estos hallazgos, concuerdan con el modelo de cáncer de pulmón LL/2 trabajado, en cuanto a los niveles de $TNF\alpha$ producidos por células dendríticas, aunque también registramos un aumento en la producción de IL-12. Sin embargo, cabe resaltar que nuestros resultados utilizando este modelo son preliminares y deben ser repetidos, entre otras cosas, para evaluar la producción de IL-10, la cual no pudimos abordar en este trabajo.

Por otro lado, es importante destacar que los resultados obtenidos en este trabajo se hicieron en un sistema celular *in vitro* simplificado, por lo que no necesariamente tiene

que reflejar lo que sucedería *in vivo*. En ese sentido, en nuestro grupo de investigación, como parte del trabajo de doctorado de la Lic. Valeria da Costa, se han estudiado las células dendríticas en el microambiente tumoral de tumores derivados de línea LL/2 parental y la H12 (Tn+). Los resultados obtenidos indican que las células dendríticas MGL2+ expresan mayores niveles de IL-10 cuando se encuentran en el microambiente de los tumores Tn+, pero no de los Tn-. Además, el estudio del eje Tn-MGL se pudo profundizar más utilizando ratones transgénicos MGL2-DTR, en los cuales la expresión de MGL2 se encuentra acoplada a la expresión del receptor de la toxina diftérica (DTR). Por lo tanto, al inyectarlos con toxina diftérica es posible depletar las células MGL2+. En estos estudios *in vivo* se vio que en presencia de las células MGL2+ y las células LL/2 Tn+, los tumores presentan linfocitos T CD4 y T CD8 con mayor producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 en relación a los tumores Tn-. En cambio, cuando se depletaron las células MGL2+, la expresión de IL-10 por los linfocitos T CD4 y T CD8 disminuyó, indicando que las células MGL2+ participan en la modulación de la respuesta inmune, en particular, favoreciendo la producción de una citoquina anti-inflamatoria, por parte de los linfocitos T CD4 y CD8.

En este trabajo también confirmamos la presencia de GalNAc terminales en glicoproteínas secretadas por parte de las células de cáncer de pulmón LL/2, al medio de cultivo, por lo que existe la posibilidad de que el antígeno Tn esté presente en ellas. Nuestra hipótesis (la cual se ilustra en la figura 25) era que las células tumorales podrían secretar proteínas al medio extracelular que fueran Tn+ y que por dicho motivo inmunomodularan de forma distinta que las Tn- a las células dendríticas o a los macrófagos.

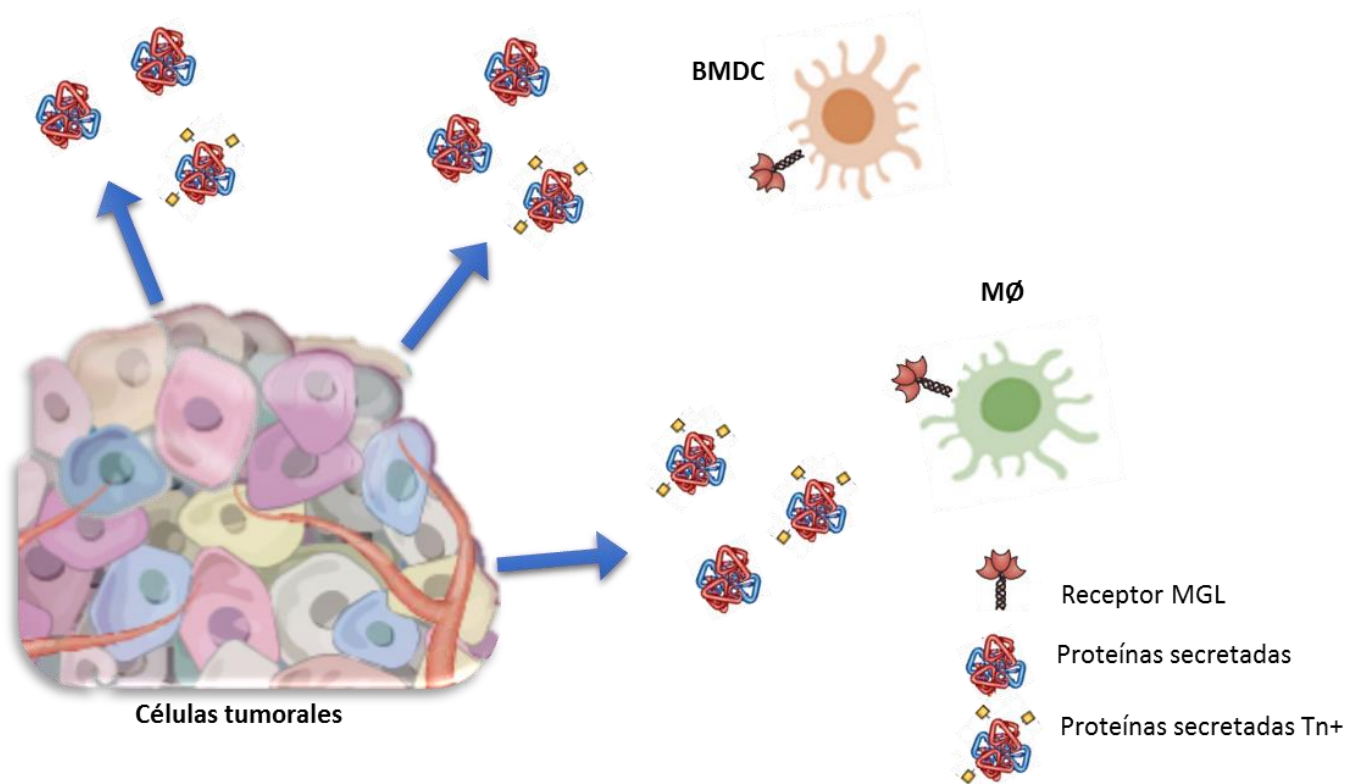


Figura 25: Hipótesis de trabajo. Se ilustra la hipótesis de lo que ocurriría en tumores con células Tn+, donde estas secretan proteínas Tn+ que inmunomodularían a los macrófagos o a las células dendríticas de forma distinta que aquellas Tn-.

Gracias a un análisis electroforético encontramos que los componentes mayoritarios en condiciones reductoras y de desnaturalización migraron alrededor de 15 kDa y que reaccionaron con la lectina específica de GalNAc terminales *Helix pomatia*. Para poder tener una idea de la identidad de dichas glicoproteínas, realizamos una búsqueda bibliográfica sobre proteínas secretadas por células tumorales de pulmón (Sung et al. 2018). Utilizando el algoritmo NetOGlyc disponible online (<https://services.healthtech.dtu.dk/>), identificamos aquellas proteínas candidatas a tener posibles sitios de O-glicosilación de tipo mucina, las cuales se muestran en la Tabla V.

Tabla V: Glicoproteínas candidatas a estar presentes en el medio condicionado de las células de cáncer de pulmón LL/2. Se muestran proteínas candidatas que tengan una probabilidad superior a 0.5 de tener sitios de O-glicosilación, los cuales se identificaron utilizando el algoritmo NetOGlyc. En el panel inferior, se muestran las proteínas que poseen un tamaño cercano a 15-20 KDa. Esta lista de proteínas se realizó a partir de proteínas presentes en el medio extracelular de células de cáncer de pulmón (Sung et al. 2018).

Nombre proteína	N° Acceso	N° sitios considerados probables de ser O-glicosilados	N° de aminoácidos totales
Fibrillin-1	NP_000129.3	118	2871
Lamin isoform A	NP_733821.1	59	664
Latent transforming growth factor beta binding protein 2	AAH78659.1	146	1821
Extracellular matrix protein 1 isoform 1 precursor	NP_004416.2	27	540
DKK3	AAQ88744.1	9	350
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	AAH52296.1	10	320
Stanniocalcin-2 precursor	NP_003705.1	16	302
Connective tissue growth factor	EAW48039.1	7	349
Histone H2B type 2-E	NP_003519.1	5	126

De las potenciales O-glicoproteínas mostradas en la Tabla 5, se indican en el panel inferior aquellas que poseen un peso molecular de entre 15 y 20 KDa. Sería interesante explorar si alguna de éstas glicoproteínas es secretada por la sublínea LL/2 Tn+ y si media algún efecto sobre la maduración de las células dendríticas.

Cabe resaltar que realizamos un ensayo preliminar con el medio condicionado total obtenido con el fin de evaluar si éste inducía un efecto en la maduración de las células dendríticas. Lamentablemente, los resultados no fueron concluyentes, y junto con la falta de tiempo para poder realizar el ensayo nuevamente, no pudimos presentarlo en este trabajo. Si eventualmente hubiera un efecto atribuible a la presencia de Tn en las proteínas secretadas al medio extracelular por parte de las células tumorales, el siguiente paso sería tratar de identificarlas. Para ello, una opción sería realizar una cromatografía de afinidad, donde en el soporte se encuentre el anticuerpo 83D4 (el cual reconoce Tn), y así hacer uso de la interacción Tn-anticuerpo para purificar las proteínas Tn+. Luego se realizaría una electroforesis con mayor porcentaje de poliacrilamida que la ya realizada, con el fin de evaluar si hay más de un componente que esté comprendido entre 15 y 25 kDa. Esto nos permitiría luego realizar análisis de proteómica, a través del aislamiento de cada banda presente, y así por espectrometría de masa, identificar las proteínas que eventualmente fueran responsables de una inmunomodulación atribuible a la presencia de Tn.

En cuanto, a los ensayos para evaluar la quimiosensibilidad a drogas quimioterapéuticas, como conclusión general, las líneas Tn+ de ambos modelos presentaron diferencias en la sensibilidad a la muerte inducida por drogas quimioterápicas con respecto a las líneas Tn-. Un hecho interesante, fue el comportamiento que tuvieron las células de cáncer de mama (4T1) cuando fueron incubadas con las drogas Paclitaxel y Gemcitabina, las cuales se utilizan para el tratamiento de dicho tipo de cáncer. Las células tumorales proliferaron en vez de morir, comportamiento que se asemeja al dado en el cáncer de mama triple negativo, donde frente a un tratamiento quimioterapéutico, el tumor crece y termina realizando metástasis (Garrido-Castro, Lin y Polyak 2019).

Como perspectivas, sería interesante probar otras concentraciones de droga, y analizar si cambian los comportamientos, respecto a los ya obtenidos. También sería de interés, utilizar drogas que se utilicen en el tratamiento de cáncer de pulmón, como se hizo para el modelo de cáncer de mama (4T1) y evaluar la respuesta. Por último, algo que estamos planificando actualmente, es analizar la quimio-resistencia de las líneas celulares derivadas de las células 4T1 *in vivo*. En este sentido, en nuestro laboratorio se ha puesto a punto el modelo tumoral de mama ortotópico, a través de la inyección de las células cancerosas en la mama de ratones BALB/c hembras (trabajo de posdoctorado de la Dra. Florencia Festari). Una vez implantadas las células, deberíamos esperar a la detección de tumores palpables de 10 x 10 mm y comenzar el tratamiento con paclitaxel. La determinación del tamaño tumoral y eventualmente el

ensayo de micrometástasis pulmonares nos permitirían determinar cual es el efecto de esta droga *in vivo*. Estos ensayos podrían completarse con estudios de transcriptómica para determinar si la expresión de genes asociados a la resistencia a drogas se encuentra incrementada en el caso de la línea 4T1-Tn+.

Conclusiones generales

Como conclusión general podemos destacar que las líneas tumorales Tn+ del modelo de cáncer pulmonar y mamario poseen capacidad diferente de modulación sobre la activación de células dendríticas y macrófagos. Aunque algunos de nuestros experimentos necesitan ser verificados (como el de co-cultivo de células LL/2 con BMDC), podemos afirmar que nuestra hipótesis planteada al iniciar este trabajo, en relación a este tema, no fue confirmada.

Por otro lado, frente a la incubación con drogas usualmente utilizadas en quimioterapia, la línea 4T1 Tn+ principalmente, mostró un comportamiento asociado a alta resistencia al Paclitaxel y Gemcitabina, que debería ser confirmado *in vivo*.

En su conjunto, esta tesina de grado contribuye al estudio de los mecanismos moleculares y celulares que median células tumorales expresando el antígeno Tn, los cuales eventualmente podrían ser aplicados en el diseño de terapias contra tumores Tn+.

Agradecimientos

- En primer lugar, a Teresa y Vale, quienes fueron mis tutoras apoyándome durante todo este proceso de formación. Quiero destacar su muy buena disposición y paciencia para enseñarme y ayudarme en lo que necesitaba.
- A mis compañeros de Laboratorio, con quienes siempre conté para ayudarme en lo que precisaba.
- A Otto por su muy buena disposición, en corregirme la Tesina y evaluarme en muy poco tiempo, dado que los plazos fueron ajustados.
- A mi familia, por brindarme siempre la posibilidad de que tuviera una buena educación.
- A Adri, por aconsejarme durante toda la carrera, por apoyarme en los momentos difíciles mientras hice la misma y por alguna cosita que otra.
- A todos aquellos que, de alguna u otra manera, hicieron esto posible.

Bibliografía

- Babino, Alvaro, Pablo Oppezzo, Stella Bianco, Enrique Barrios, Nora Berois, Héctor Navarrete, and Eduardo Osinaga. 2000. "Tn Antigen Is a Pre-Cancerous Biomarker in Breast Tissue and Serum in N-Nitrosomethylurea-Induced Rat Mammary Carcinogenesis." *International Journal of Cancer* 86: 753–59.
- Bacac, Marina, and Ivan Stamenkovic. 2008. "Metastatic Cancer Cell." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 3 (1): 221–47.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151523>.
- Bray, Freddie, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rebecca L. Siegel, Lindsey A. Torre, and Ahmedin Jemal. 2018. "Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68 (6): 394–424.
<https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- Brihimi-Horn, M. Christiane, and Jacques Pouyssegur. 2009. "HIF at a Glance." *Journal of Cell Science* 122 (8): 1055–57. <https://doi.org/10.1242/jcs.035022>.
- Cardoso, A. P., M. L. Pinto, A. T. Pinto, M. I. Oliveira, M. T. Pinto, R. Gonçalves, J. B. Relvas, et al. 2014. "Macrophages Stimulate Gastric and Colorectal Cancer Invasion through EGFR Y 1086, c-Src, Erk1/2 and Akt Phosphorylation and SmallGTPase Activity." *Oncogene* 33 (16): 2123–33.
<https://doi.org/10.1038/onc.2013.154>.
- "Chemotherapy for Breast Cancer | American Cancer Society." n.d. Accessed November 26, 2019. <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/chemotherapy-for-breast-cancer.html>.
- "Chemotherapy for Breast Cancer Treatment." n.d. Accessed November 26, 2019. <https://www.webmd.com/breast-cancer/treatment-chemotherapy#1>.
- Chen, Yibing, Yucen Song, Wei Du, Longlong Gong, Haocai Chang, and Zhengzhi Zou. 2019. "Tumor-Associated Macrophages: An Accomplice in Solid Tumor Progression." *Journal of Biomedical Science* 26 (1): 78.
<https://doi.org/10.1186/s12929-019-0568-z>.
- Chia, Joanne, Germaine Goh, and Frederic Bard. 2016. "Short O-GalNAc Glycans: Regulation and Role in Tumor Development and Clinical Perspectives." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1860 (8): 1623–39.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.03.008>.
- Dube, Danielle H., and Carolyn R. Bertozzi. 2005. "Glycans in Cancer and Inflammation - Potential for Therapeutics and Diagnostics." *Nature Reviews Drug Discovery* 4 (6): 477–88. <https://doi.org/10.1038/nrd1751>.

- Dunn, Gavin P., Allen T. Bruce, Hiroaki Ikeda, Lloyd J. Old, and Robert D. Schreiber. 2002. "Cancer Immunoediting: From Immunosurveillance to Tumor Escape." *Nature Immunology* 3 (11): 991–98. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>.
- Folkman, Judah. 2002. "Role of Angiogenesis in Tumor Growth and Metastasis." *Seminars in Oncology* 29 (6 Suppl 16): 15–18. <https://doi.org/10.1053/sonc.2002.37263>.
- Freeze, Hudson H., and Markus Aebi. 2005. "Altered Glycan Structures: The Molecular Basis of Congenital Disorders of Glycosylation." *Current Opinion in Structural Biology* 15 (5): 490–98. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.08.010>.
- Freire, T., and Eduardo Osinaga. 2003. "Immunological and Biomedical Relevance of the Tn Antigen." *Inmunologia* 22 (1): 27–38.
- Fu, C., H. Zhao, Y. Wang, H. Cai, Y. Xiao, Y. Zeng, and H. Chen. 2016. "Tumor-Associated Antigens: Tn Antigen, STn Antigen, and T Antigen." *Hla* 88 (6): 275–86. <https://doi.org/10.1111/tan.12900>.
- Fucikova, Jitka, Lenka Palova-Jelinkova, Jirina Bartunkova, and Radek Spisek. 2019. "Induction of Tolerance and Immunity by Dendritic Cells: Mechanisms and Clinical Applications." *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02393>.
- Garrido-Castro, Ana C, Nancy U Lin, and Kornelia Polyak. 2019. "Insights into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment." <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1177>.
- Glasner, Ariella, Assi Levi, Jonatan Enk, Batya Isaacson, Sergey Viukov, Shari Orlanski, Alon Scope, et al. 2018. "NKp46 Receptor-Mediated Interferon- γ Production by Natural Killer Cells Increases Fibronectin 1 to Alter Tumor Architecture and Control Metastasis." *Immunity* 48 (1): 107-119.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.12.007>.
- Gonzalez, Hugo, Catharina Hagerling, and Zena Werb. 2018. "Roles of the Immune System in Cancer: From Tumor Initiation to Metastatic Progression." *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/GAD.314617.118>.
- Goswami, Sumanta, Erik Sahai, Jeffrey B. Wyckoff, Michael Cammer, Dianne Cox, Fiona J. Pixley, E. Richard Stanley, Jeffrey E. Segall, and John S. Condeelis. 2005. "Macrophages Promote the Invasion of Breast Carcinoma Cells via a Colony-Stimulating Factor-1/Epidermal Growth Factor Paracrine Loop." *Cancer Research* 65 (12): 5278–83. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1853>.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell* 144 (5): 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

- Higashi, Nobuaki, Kouki Fujioka, Kaori Denda-Nagai, Shin Ichi Hashimoto, Shigenori Nagai, Taku Sato, Yuko Fujita, et al. 2002. "The Macrophage C-Type Lectin Specific for Galactose/N-Acetylgalactosamine Is an Endocytic Receptor Expressed on Monocyte-Derived Immature Dendritic Cells." *Journal of Biological Chemistry* 277 (23): 20686–93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202104200>.
- Hinshaw, Dominique C., and Lalita A. Shevde. 2019. "The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression." *Cancer Research*, 1–11. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-18-3962>.
- Jeannin, Pascale, Léa Paolini, Clement Adam, and Yves Delneste. 2018. "The Roles of CSFs on the Functional Polarization of Tumor-Associated Macrophages." *FEBS Journal* 285 (4): 680–99. <https://doi.org/10.1111/febs.14343>.
- Kooyk, Yvette Van, and Teunis B H Geijtenbeek. 2003. "DC-SIGN: Escape Mechanism for Pathogens." *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri1182>.
- Lee, Kha Liang, Yung Che Kuo, Yuan Soon Ho, and Yen Hua Huang. 2019. "Triple-Negative Breast Cancer: Current Understanding and Future Therapeutic Breakthrough Targeting Cancer Stemness." *Cancers*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers11091334>.
- Lenos, Kristiaan, Jeroen A.C.M. Goos, Ilona M. Vuist, Sjoerd H. den Uil, Pien M. Delis-van Diemen, Eric J.Th Belt, Hein B.A.C. Stockmann, et al. 2015. "MGL Ligand Expression Is Correlated to BRAF Mutation and Associated with Poor Survival of Stage III Colon Cancer Patients." *Oncotarget* 6 (28): 26278–90. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4495>.
- Lin, Tzu-Chi, Syue-Ting Chen, Min-Chuan Huang, John Huang, Chia-Lang Hsu, Hsueh-Fen Juan, Ho-Hsiung Lin, and Chi-Hau Chen. 2017. "GALNT6 Expression Enhances Aggressive Phenotypes of Ovarian Cancer Cells by Regulating EGFR Activity." www.impactjournals.com/oncotarget.
- Liu, Bing, Shimeng Pan, Yang Xiao, Qianqian Liu, Jingchao Xu, and Li Jia. 2018. "LINC01296/MiR-26a/GALNT3 Axis Contributes to Colorectal Cancer Progression by Regulating O-Glycosylated MUC1 via PI3K/AKT Pathway." <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0994-x>.
- Michiels, Carine. 2004. "Physiological and Pathological Responses to Hypoxia." *American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology Inc. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63747-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63747-9).
- Ministerio de Salud Pública. 2019. "4 de Febrero Día Mundial Contra El Cáncer | Ministerio de Salud Pública." 2019. <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/noticias/4-de-febrero-dia-mundial-contra-el-cancer>.
- Mittal, Deepak, Matthew M. Gubin, Robert D. Schreiber, and Mark J. Smyth. 2014.

- “New Insights into Cancer Immunoediting and Its Three Component Phases- Elimination, Equilibrium and Escape.” *Current Opinion in Immunology* 27 (1): 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.004>.
- Mortezai, N., H. N. Behnken, A.-K. Kurze, P. Ludewig, F. Buck, B. Meyer, and C. Wagener. 2013. “Tumor-Associated Neu5Ac-Tn and Neu5Gc-Tn Antigens Bind to C-Type Lectin CLEC10A (CD301, MGL).” *Glycobiology* 23 (7): 844–52. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt021>.
- “National Cancer Institute.” 2019. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
- Nogimori, Kenichi, Tomoko Hori, Koji Kawaguchi, Takayuki Fukui, Shinji Mii, Hiroshi Nakada, Yasuyuki Matsumoto, et al. 2016. “Increased Expression Levels of PpGalNAc-T13 in Lung Cancers: Significance in the Prognostic Diagnosis.” *International Journal of Oncology* 49 (4): 1369–76. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3638>.
- Ostuni, Renato, Franz Kratochvill, Peter J. Murray, and Gioacchino Natoli. 2015. “Macrophages and Cancer: From Mechanisms to Therapeutic Implications.” *Trends in Immunology* 36 (4): 229–39. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.02.004>.
- Park, So-Yeon, Jang-Hyun Choi, and Jeong-Seok Nam. 2019. “Targeting Cancer Stem Cells in Triple-Negative Breast Cancer.” <https://doi.org/10.3390/cancers11070965>.
- Peixoto, Andreia, Marta Relvas-Santos, Rita Azevedo, Lúcio Lara Santos, and José Alexandre Ferreira. 2019. “Protein Glycosylation and Tumor Microenvironment Alterations Driving Cancer Hallmarks.” *Frontiers in Oncology* 9 (MAY): 1–24. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00380>.
- Pinho, Salomé S., and Celso A. Reis. 2015. “Glycosylation in Cancer: Mechanisms and Clinical Implications.” *Nature Reviews Cancer* 15 (9): 540–55. <https://doi.org/10.1038/nrc3982>.
- Raes, Geert, Lea Brys, Bhola K. Dahal, Jef Brandt, Johan Grooten, Frank Brombacher, Guido Vanham, et al. 2005. “Macrophage Galactose-Type C-Type Lectins as Novel Markers for Alternatively Activated Macrophages Elicited by Parasitic Infections and Allergic Airway Inflammation.” *Journal of Leukocyte Biology* 77 (3): 321–27. <https://doi.org/10.1189/jlb.0304212>.
- Reily, Colin, Tyler J Stewart, Matthew B Renfrow, and Jan Novak. 2019. “Glycosylation in Health and Disease HHS Public Access.” <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0129-4>.
- Reis, Celso A., Hugo Osorio, Luisa Silva, Catarina Gomes, and Leonor David. 2010. “Alterations in Glycosylation as Biomarkers for Cancer Detection.” *Journal of Clinical Pathology* 63 (4): 322–29. <https://doi.org/10.1136/jcp.2009.071035>.

- Reynolds, Ian S., Michael Fichtner, Deborah A. McNamara, Elaine W. Kay, Jochen H.M. Prehn, and John P. Burke. 2019. "Mucin Glycoproteins Block Apoptosis; Promote Invasion, Proliferation, and Migration; and Cause Chemoresistance through Diverse Pathways in Epithelial Cancers." *Cancer and Metastasis Reviews* 38 (1–2): 237–57. <https://doi.org/10.1007/s10555-019-09781-w>.
- Rodrigues, Joana G., Meritxell Balmaña, Joana A. Macedo, Juliana Poças, Ângela Fernandes, Julio Cesar M. de-Freitas-Junior, Salomé S. Pinho, et al. 2018. "Glycosylation in Cancer: Selected Roles in Tumour Progression, Immune Modulation and Metastasis." *Cellular Immunology* 333 (March): 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.03.007>.
- Rodríguez, Ernesto, Sjoerd T.T. Schetters, and Yvette Van Kooyk. 2018. "The Tumour Glyco-Code as a Novel Immune Checkpoint for Immunotherapy." *Nature Reviews Immunology* 18 (3): 204–11. <https://doi.org/10.1038/nri.2018.3>.
- Samanta, Debangshu, Daniele M. Gilkesa, Pallavi Chaturvedia, Lisha Xiang, and Gregg L. Semenza. 2014. "Hypoxia-Inducible Factors Are Required for Chemotherapy Resistance of Breast Cancer Stem Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (50): E5429–38. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421438111>.
- Satoskar, Abhay, Ricardo Silvestre, Muhammad Zubair Shabbir, Teresa Freire, Ernesto Rodríguez, Paula Carasi, Sofía Frigerio, et al. 2017. "Fasciola Hepatica Immune Regulates CD11c + Cells by Interacting with the Macrophage Gal/Galnac Lectin." *Immunol* 8: 264. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00264>.
- Schito, Luana, and Gregg L. Semenza. 2016. "Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression." *Trends in Cancer* 2 (12): 758–70. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.10.016>.
- Schreiber, Robert D., Lloyd J. Old, and Mark J. Smyth. 2011. "Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion." *Science* 331 (6024): 1565–70. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>.
- Shankaran, Vijay, Hiroaki Ikeda, Allen T. Bruce, J. Michael White, Paul E. Swanson, Lloyd J. Old, and Robert D. Schreiber. 2001. "IFN γ , and Lymphocytes Prevent Primary Tumour Development and Shape Tumour Immunogenicity." *Nature* 410 (6832): 1107–11. <https://doi.org/10.1038/35074122>.
- Sica, Antonio, Tiziana Schioppa, Alberto Mantovani, and Paola Allavena. 2006. "Tumour-Associated Macrophages Are a Distinct M2 Polarised Population Promoting Tumour Progression: Potential Targets of Anti-Cancer Therapy." *European Journal of Cancer* 42 (6): 717–27. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.01.003>.

- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk. 1985. "Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid." *Analytical Biochemistry* 150 (1): 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
- Sung, Hye Jin, Jung Mo Ahn, Yeon Hee Yoon, Sang Su Na, Young Jin Choi, Yong In Kim, Soo Youn Lee, Eung Bae Lee, Sukki Cho, and Je Yoel Cho. 2018. "Quiescin Sulfhydryl Oxidase 1 (QSOX1) Secreted by Lung Cancer Cells Promotes Cancer Metastasis." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (10): 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms19103213>.
- Thakur, Chitra, and Fei Chen. 2019. "Connections between Metabolism and Epigenetics in Cancers." *Seminars in Cancer Biology*, no. April. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.06.006>.
- Upham, Jacqueline P, Danielle Pickett, Tatsuro Irimura, E Margot Anders, and Patrick C Reading. 2010. "Macrophage Receptors for Influenza A Virus: Role of the Macrophage Galactose-Type Lectin and Mannose Receptor in Viral Entry." *JOURNAL OF VIROLOGY* 84 (8): 3730–37. <https://doi.org/10.1128/JVI.02148-09>.
- Vasan, Neil, José Baselga, and David M Hyman. 2019. "A View on Drug Resistance in Cancer." *Nature* 575. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1730-1>.
- Vliet, Sandra J. van, Sylvie Bay, Ilona M. Vuist, Hakan Kalay, Juan J. García-Vallejo, Claude Leclerc, and Yvette van Kooyk. 2013. "MGL Signaling Augments TLR2-Mediated Responses for Enhanced IL-10 and TNF- α Secretion." *Journal of Leukocyte Biology* 94 (2): 315–23. <https://doi.org/10.1189/jlb.1012520>.
- Vliet, Sandra J. van, Ellis van Liempt, Teunis B H Geijtenbeek, and Yvette van Kooyk. 2006. "Differential Regulation of C-Type Lectin Expression on Tolerogenic Dendritic Cell Subsets." *Immunobiology* 211 (6–8): 577–85. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2006.05.022>.
- Vliet, Sandra J. van, Ellis van Liempt, Eirikur Saeland, Corlien A. Aarnoudse, Ben Appelmelk, Tatsuro Irimura, Teunis B.H. Geijtenbeek, et al. 2005. "Carbohydrate Profiling Reveals a Distinctive Role for the C-Type Lectin MGL in the Recognition of Helminth Parasites and Tumor Antigens by Dendritic Cells." *International Immunology* 17 (5): 661–69. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh246>.
- Wang, Neng, Weiping Liu, Yifeng Zheng, Shengqi Wang, Bowen Yang, Min Li, Juxian Song, et al. 2018. "CXCL1 Derived from Tumor-Associated Macrophages Promotes Breast Cancer Metastasis via Activating NF-KB/SOX4 Signaling." *Cell Death and Disease* 9 (9). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0876-3>.
- Wijdeven, Ruud H., Baoxu Pang, Yehuda G. Assaraf, and Jacques Neefjes. 2016. "Old Drugs, Novel Ways out: Drug Resistance toward Cytotoxic Chemotherapeutics."

- Drug Resistance Updates* 28: 65–81. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.07.001>.
- World Health Organization. 2015. "Cáncer." 2015. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- Wyckoff, Jeffrey, Weigang Wang, Elaine Y. Lin, Yarong Wang, Fiona Pixley, E. Richard Stanley, Thomas Graf, Jeffrey W. Pollard, Jeffrey Segall, and John Condeelis. 2004. "A Paracrine Loop between Tumor Cells and Macrophages Is Required for Tumor Cell Migration in Mammary Tumors." *Cancer Research* 64 (19): 7022–29. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1449>.
- Zelensky, Alex N, and Jill E Gready. 2005. "The C-Type Lectin-like Domain Superfamily." *FEBS Journal* 272 (24): 6179–6217. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05031.x>.
- Zhang, Shengle, Helen S. Zhang, Victor E. Reuter, Susan F. Slovin, Howard I. Scher, and Philip O. Livingston. 1998. "Expression of Potential Target Antigens for Immunotherapy on Primary and Metastatic Prostate Cancers." *Clinical Cancer Research* 4 (2): 295–302.
- Zhao, Xixi, Jingkun Qu, Yuchen Sun, Jizhao Wang, Xu Liu, Feidi Wang, Hong Zhang, et al. 2017. "Prognostic Significance of Tumor-Associated Macrophages in Breast Cancer: A Meta-Analysis of the Literature." *Oncotarget*. Impact Journals LLC. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15736>.

